

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1921-1922

N° 96

ÉTUDE CRITIQUE

DE

QUELQUES MÉTHODES SIMPLES

UTILISÉES POUR

L'ANALYSE CHIMIQUE DU SANG

DOSAGE des Chlorures, du Phosphore, du Glucose
de l'Azote non proteique, de l'Urée, de l'Acide urique

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Mention « Pharmacie »

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 24 Février 1922

PAR

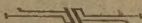
Maurice-François-Philippe BORDE

Né le 17 Août 1889, à Sainte-Terre (Gironde)

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE

Examineurs de la Thèse

{	MM. DUPOUY, professeur,	<i>Président.</i>
	BARTHE, professeur,	{ <i>Juges.</i>
	CHELLE, professeur,	
	LABAT, agrégé,	



IMPRIMERIE LIBOURNAISE

88, rue Président-Carnot et rue Orbe, 27

1922

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1921-1922

N° 96

ÉTUDE CRITIQUE

DE

QUELQUES MÉTHODES SIMPLES

UTILISÉES POUR

L'ANALYSE CHIMIQUE DU SANG

DOSAGE des Chlorures, du Phosphore, du Glucose
de l'Azote non proteique, de l'Urée, de l'Acide urique

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Mention « Pharmacie »

présentée et soutenue publiquement le Vendredi 24 Février 1922

R. UNIV.

BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PAR

Maurice-François-Philippe BORDE

Né le 17 Août 1889, à Sainte-Terre (Gironde)

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE

Examineurs de la Thèse

{	MM. DUPOUY, professeur,	<i>Président.</i>
	BARTHE, professeur,	
	CHELLE, professeur,	{ <i>Juges.</i>
	LABAT, agrégé,	

IMPRIMERIE LIBOURNAISE

68, rue Président-Carnot et rue Orbe, 27

1922

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

M. SIGALAS Doyen.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. LANELONGUE, BADAL, JOLYET, PITRES, GUILLAUD.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique interne	ARNOZAN.	Zoologie et Parasitologie....	MANDOUL.
	CASSAËT.	Médecine expérimentale....	FERRÉ.
	CHAVANNAZ.	Clinique ophtalmologique...	LAGRANGE..
Clinique externe	VILLAR.	Clinique chirurgicale infantile	
Pathologie et thérapeutique		et Orthopédie	DENUCÉ.
générales.....	CRUCHET.	Clinique gynécologique.....	BEGOUIN.
Clinique d'accouchements...	RIVIÈRE.	Clinique médicale des maladies	
Anatomie pathologique.....	SABRAZES.	des enfants.....	MOUSSOUS.
Anatomie.....	PICQUE.	Chimie biologique.....	DENIGES.
Anatomie générale et histolog.	G. DUBREUIL.	Physique pharmaceutique....	SIGALAS.
Physiologie.....	PACHON.	Pathologie exotique.....	LE DANTEC.
Hygiène.....	AUCHE.	Clinique des maladies cutanées	
Médecine légale.....	VERGER.	et syphilitiques.....	W.DUBREUILH
Physique biologique et Clini-		Clinique des maladies des	
que d'électricité médicale..	BERGONIE.	voies urinaires.....	POUSSON.
Chimie.....	CHELLE.	Clinique psychiatrique.....	ABADIE.
Botanique et matière médicale	BEILLE.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie	MOURE.
Pharmacie.....	DUPOUY.	Toxicologie.....	BARTHE.
			M. PRINCETEAU.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie et embryologie...{	N...		LEURET.
	N...	Médecine générale.....{	DUPERIÉ.
Histologie.....	LACOSTE (chargé).		CREYX.
Physiologie.....	DELAUNAY.		MICHELEAU.
Anatomie pathologique.....	MURATET.	Maladies mentales.....	PERRENS.
Parasitologie et Sciences na-		Médecine légale.....	LANDE.
turelles.....	R. SIGALAS (chargé)		GUYOT.
	N...	Chirurgie générale.....	ROCHER.
Physique biologique et médi-			DUVERGEY.
cale.....	RÉCHOU.		PAPIN.
Chimie biologique et médicale	N...	Obstétrique.....	PERY.
	PETGES.	Ophtalmologie.....	FAUGÈRE.
Médecine générale.....{	J. CARLES.		TEULIÈRES.
	MAURIAC.	Pharmacie.....	LABAT.
			N...

CHARGÉS DE COURS :

Cours de Clinique dentaire	MM. CAVALIÉ.
Cours complémentaire de Thérapeutique et Pharmacologie	J. CARLES.
Cours complémentaire de Médecine opératoire.....	VENOT.
Cours complémentaire d'Accouchements	PERY.
Cours complémentaire d'Ophtalmologie	CABANNES.
Cours complémentaire de Puericulture.....	ANDERODIAS.
Cours complémentaire de Climatologie et Hydrologie médicale.. ..	SELLIER.
Cours complémentaire de démonstrations et préparations pharmaceutiques.	LABAT.
Cours complémentaire de Chimie.....	RANGIER.
Cours complémentaire de Vénérologie	PETGES.
Cours complémentaire de Pathologie interne.....	MAURIAC.
Cours complémentaire de Pathologie externe.....	GUYOT.
Cours complémentaire d'Orthopédie chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes.....	ROCHER.
Cours complémentaire annexe. — Prothèse et rééducation professionnelle.	GOURDON.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ LABAT

Chargé du Cours complémentaire
de démonstration et préparation pharmaceutiques

Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Instruction Publique

Hommage de respectueuse gratitude.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE DOCTEUR DUPOUY

• Professeur de pharmacie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux

Officier de l'Instruction Publique

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

On sait, sans qu'il soit utile d'insister, le profit que la physiologie a retiré de l'analyse chimique du sang. Elle a pu ainsi éclairer bien des phénomènes naturels ou pathologiques liés au processus intime de la nutrition ou aux réactions de défense de nos tissus et de nos humeurs. La clinique, à son tour, ne devait pas manquer de s'adresser à une source aussi précieuse d'information.

Depuis longtemps les biologistes connaissaient des méthodes rigoureuses pour doser les différents éléments du sang. Mais, si ces procédés n'avaient pour ainsi dire pas franchi les frontières qui séparent la physiologie de la clinique, c'est, ou bien qu'ils étaient le plus souvent d'exécution longue et délicate, ou bien qu'ils exigeaient un trop grand volume de liquide nécessitant parfois une véritable saignée. Ces complications s'opposaient, en outre, aux examens répétés chez un même sujet.

Cependant, depuis les travaux de Widal et de ses élèves, on savait doser l'urée sur une petite quantité de sang par un procédé que d'autres auteurs ont modifié et conduit à un état très proche de la perfection. Mais, dans ces dernières années, à la suite de nombreuses recherches effectuées dans tous les pays, de nouvelles méthodes, plus simples, dites microchimiques ou microanalytiques, se sont rapidement généralisées et sont entrées victorieusement sur le terrain de la clinique. Ces termes « microchimique » « microanalytique », veulent dire, ici, que ces méthodes s'effectuent sur de très petites quantités de substances à examiner et il est intéressant de noter que l'analyse chimique a suivi en biologie une route parallèle à celle que lui

a fait suivre Pregl et ses émules en chimie générale. Toutefois, tandis que dans ce cas, les méthodes sont fort délicates et utilisent pour la plupart des balances d'extrême précision, en biologie, au contraire, les procédés sont simples, font surtout appel à la colorimétrie ou à la diaphanométrie et peuvent être mis entre toutes les mains pour peu qu'elles soient habiles.

Beaucoup de ces procédés exigent des réactifs spéciaux parfois difficiles à se procurer pour le pharmacien éloigné des grands centres. D'autres, malgré l'apparence de leur rigueur mathématique, donnent souvent des résultats peu précis.

Aussi, nous sommes-nous proposé d'examiner un certain nombre de ces méthodes. Nous nous efforcerons, en outre, de fixer certains points très importants dans la pratique et notamment les suivants :

1° On peut effectuer une opération déterminée soit avec le sérum, soit avec le sang complet. Dans le premier cas, pour avoir un volume déterminé de sérum après coagulation spontanée, il faut prélever une quantité au moins triple de sang, ce qui n'est pas sans présenter souvent de réelles difficultés pour le médecin et pour le malade. Dans le second cas, en additionnant le sang d'oxalate ou de citrate alcalin pour éviter sa coagulation, on réduit le volume de liquide à prélever au minimum ; c'est un avantage à tous les points de vue.

Nous dirons tout de suite, pour ne pas y revenir, que, dans ce dernier cas, nous avons toujours opéré avec le sang oxalaté. Nous préparions des tubes à essai d'une contenance de 25^{cc} environ, bien propres, munis d'un bon bouchon et stérilisés, si besoin, dans lesquels nous disposions à l'avance un centimètre cube d'une solution aqueuse au 1/10 d'oxalate neutre de potassium. Au moment du besoin, on inclinait le tube en tous sens pour promener la solution oxalatée sur toutes les parois, puis on recueillait assez de sang pour remplir presque tout le tube. On bouchait et on renversait le tube deux ou trois fois sur lui-même pour tout mélanger. Avant toute recherche, on mesurait le volume total du liquide et on tenait compte, pour les calculs, de la faible dilution produite par la présence du centimètre cube de solution anticoagulante. Avec un tel volume de sang, il est possible, comme on le verra, d'effectuer tous les dosages dont nous avons parlé plus haut ;

2° Qu'on opère sur le sang ou sur le sérum, il faut les désal-

buminer. On a donné pour cela de nombreux procédés. Les uns ont pour but de détruire les matières albuminoïdes et s'appliquent seulement au dosage des éléments minéraux. Les autres sont des agents de précipitation et d'emploi plus général, s'appliquant à la détermination de tous les composés qui nous occupent.

Enfin, parmi ces réactifs, certains sont utilisables pour tous les dosages, d'autres ne le sont pas. Nous aurons donc à indiquer leurs avantages et leurs inconvénients suivant le cas.

Nous n'avons pas la prétention d'avoir épuisé le sujet de l'analyse simplifiée du sang, même dans les limites étroites que nous nous sommes tracées. Il faudrait pour cela un volume considérable, des mois et des années peut-être de recherche et de travail, si considérable est le nombre des mémoires publiés sur ce sujet. Notre but a été plus modeste, choisir parmi les procédés qui nous ont paru les plus simples, ceux qui seront le plus commodément exécutés par le pharmacien, les lui signaler, lui en donner une technique facile, adaptée aux ressources et aux moyens d'un modeste laboratoire. Si nous avons réussi, nous penserons n'avoir pas perdu le temps que nous ont demandé de longues et ingrates opérations de contrôle, tout en rendant service à nos confrères.

CHAPITRE PREMIER

Dosage des Chlorures

Toutes les méthodes que nous avons étudiées, sauf une, utilisent le procédé classique de Charpentier ⁽¹⁾ ou celui de Mohr, elles ne diffèrent entre elles que par le moyen employé pour se débarrasser des substances proteïques. C'est à ce point de vue que nous les classerons, en nous inspirant des idées directrices indiquées dans notre introduction.

I. — Dosage des Chlorures après destruction intégrale de l'albumine

MÉTHODE DE LAUDAT ⁽²⁾

Cette méthode est en somme celle que M. G. Denigès a fait connaître depuis longtemps pour le dosage des chlorures dans l'urine ⁽³⁾. Elle consiste à détruire la matière organique par l'acide azotique et le permanganate de potasse à chaud, en présence d'un excès d'azotate d'argent.

⁽¹⁾ CHARPENTIER — *Bull. de la Soc. des Ingénieurs Civils* (Juillet 1870).

⁽²⁾ LAUDAT. — Dosage du chlore dans le sérum sanguin et dans les liquides albumineux de l'organisme. — *Journal de Pharmacie et de Chimie* (10 Septembre 1917).

⁽³⁾ G. DENIGÈS. — Note sur le dosage des chlorures dans l'urine. — *Bull. des Trav. de la Soc. de Pharmacie de Bordeaux* (1886, p. 144) et 1^{re} édition du *Précis de Chimie analytique* (1898, p. 738).

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES.

a) Solution d'azotate d'argent à 29 gr. 06 par litre étendue à 1/2.

Cette solution est à lecture directe lorsqu'on opère sur 5^{cc} de liquide chloruré.

b) Solution de sulfocyanure d'ammonium correspondant à la solution précédente, à 12 gr. 99 par litre.

c) Solution saturée de permanganate de potasse.

d) Acide azotique par 40° B (D = 1.41).

e) Solution d'alun de fer à 5 p. 100.

B. — TECHNIQUE.

Dans une capsule de porcelaine blanche, mettre à l'aide d'une pipette à un trait :

5^{cc} de sang ou de sérum, ajouter l'eau distillée ayant servi à laver la pipette, puis :

10^{cc} de solution d'azote d'argent titrée.

6^{cc} de solution saturée de permanganate.

10^{cc} d'acide azotique pur.

Chauffer jusqu'à obtention d'un liquide clair dans lequel se dépose le précipité de chlorure d'argent. Prolonger quelques minutes l'ébullition pour libérer tout le chlore de ses combinaisons organiques possibles. Refroidir, compléter à 100^{cc} environ avec de l'eau distillée et titrer l'excès d'argent après addition d'alun de fer, à l'aide du sulfocyanure d'ammonium, jusqu'à teinte rougeâtre faible et persistante.

Soit n^{cc} employés : (10 — n) exprime directement la quantité, en grammes, de chlorure de sodium pour un litre de sang ou de sérum.

Nous nous sommes demandé si on ne pourrait pas réduire la prise d'essai, tout en conservant une précision aussi grande. Nous avons donc fait des titrages comparatifs en opérant sur 5^{cc} et 2^{cc} de sang ou de sérum en employant les doses suivantes des réactifs nécessaires. Mais, dans le cas où nous effectuons le dosage sur 2^{cc} de liquide, nous employons la solution argentique à 29 gr. 06 diluée à 1/5 ainsi qu'une solution de sulfocyanure lui correspondant. On prend alors :

2^{cc} de sang.

2^{cc} 5 de solution de permanganate de potasse.

10^{cc} de solution d'azotate d'argent à 29 gr. 06 diluée à 1/5.

4^{cc} d'acide azotique pur.

La technique est absolument la même que précédemment, les

calculs aussi sont les mêmes, c'est-à-dire que $(10 - n)$ exprime les grammes de chlorure d'un litre de serum ou de sang. Nous avons constaté que la sensibilité et l'exactitude du dosage restaient les mêmes, ainsi qu'on pourra s'en rendre compte en examinant le tableau ci-après :

	SANG		SÉRUM	
	5 ^{cc}	2 ^{cc}	5 ^{cc}	2 ^{cc}
Bœuf	4.44	4.4		
Mouton	5.20	5.10		
Mouton	5.90	5.85		
Mouton	5.4	5.35	6.05	5.9
Bœuf	5	4.9	5.6	5.5
Veau	4.9	4.95	6	6.1
Veau	5.15	5.1	6	5.9
Mouton	5.4	5.3	6.3	6.2
Veau	5	5	5.40	5.40
Veau	5.15	5.1	5.7	5.7
Mouton	5.6	5.6	6.5	6.6
Mouton	5.45	5.5	6.5	6.6

Tout en respectant l'exactitude de l'opération, cette réduction de la prise d'essai présente donc un sérieux avantage, puisque souvent on ne dispose que d'une minime quantité de sang. Cette méthode simple et précise nous servira de terme de comparaison pour étudier les autres procédés de dosage des chlorures.

Nous devons ajouter que nous avons vérifié les affirmations de Laudat en ce qui concerne son exactitude. Cet auteur a, en effet, comparé son procédé avec les procédés très exacts de Denigès et de Charpentier, ainsi qu'avec la méthode pondérale et a obtenu dans les résultats les concordances les plus satisfaisantes.

II. — Dosage des Chlorures après insolubilisation des matières albuminoïdes

Pour nous débarrasser des matières albuminoïdes, nous avons utilisé les trois réactifs les plus usités dans ce but : l'acide tungstique (Folin et Wu), l'acide métaphosphorique (Denigès), l'acide trichloracétique (Moog). Dans une première série d'essais,

nous nous sommes efforcé d'obtenir un filtrat aussi concentré que possible en vue de l'utiliser aussi pour le dosage gazométrique de l'urée.

Voici la technique employée pour la désalbumination dans cette catégorie d'essais :

Désalbumination par l'acide tungstique et dosage

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution de tungstate de soude à 10 p. 100.

b) Acide sulfurique 2/3 N.

B. TECHNIQUE.

A 10^{cc} de sang, ajouter 10^{cc} de solution de tungstate de soude à 10 p. 100 et 10^{cc} d'acide sulfurique 2/3 N. Agiter vigoureusement et au bout de 15 minutes, filtrer sur filtre sans plis placé dans un entonnoir à filtration rapide de Joulie ou mieux centrifuger ⁽¹⁾ Le liquide filtré représente le sang dilué au tiers.

Pour le dosage, prendre 6^{cc} de ce liquide représentant 2^{cc} de sang, y ajouter 10^{cc} de solution d'azotate d'argent à 29^{cc} 06 diluée 1/5, 3^{cc} d'acide azotique pur et 5^{cc} de solution d'alun de fer à 5 p. 100. Puis verser goutte à goutte la solution de sulfocyanure à 12^{gr} 99 diluée au 1/5 jusqu'à teinte rougeâtre. Soit n^{cc} employés (10-n) représente en grammes la quantité de chlorure de sodium contenue dans un litre de sang.

Désalbumination par l'acide métaphosphorique et dosage

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution de métaphosphate de soude à 10 gr. p. 100.

b) Acide sulfurique pur à 1 p. 10 en volume.

B. — TECHNIQUE.

A 10^{cc} de sang, ajouter 8^{cc} de solution de métaphosphate de soude à 10 p. 100 et 2^{cc} d'acide sulfurique à 1 p. 10. Agiter vigoureusement et, au bout de 15 minutes, filtrer sur filtre sans plis, placé sur entonnoir à filtration rapide de Joulie ou centrifuger.

⁽¹⁾ Toutes les fois qu'on le pourra, il est préférable d'user du centrifugeur électrique qui permet d'obtenir plus rapidement un liquide clair plus abondant.

Le liquide représente le sang dilué au 1/2.

Pour le dosage, prendre 4^{cc} de liquide représentant 2^{cc} de sang, opérer ensuite comme il a été dit plus haut pour le dosage avec l'acide tungstique.

Désalbumination par l'acide trichloracétique et dosage

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

Solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100.

B. — TECHNIQUE.

A 10^{cc} de sang ou de sérum, ajouter 10^{cc} de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100, agiter vivement et, au bout de 15 minutes, filtrer ou centrifuger comme il a été dit précédemment.

Le liquide représente le sang dilué au 1/2.

Pour le dosage, prendre 4^{cc} de ce liquide représentant 2^{cc} de sang et opérer comme il a été dit plus haut pour l'acide tungstique.

Pour nous rendre compte de la précision obtenue avec ces différentes techniques, nous avons opéré d'abord sur des solutions aqueuses de chlorure de sodium de titre connu et traitées comme s'il s'agissait de sang. Les dosages ont été effectués par la méthode de Charpentier-Vohlard.

TITRE DE LA SOLUTION	CHLORURES TROUVÉS		
	SOLUTION TRAITÉE PAR		
	l'Acide Métaphosphorique	l'Acide Tungstique	l'Acide Trichloracétique
5 ‰ 1 ^{er} dosage	2 gr. 3	4 gr.	4 gr. 9
5 ‰ 2 ^e dosage	2 gr. 1	3 gr. 8	4 gr. 8

Pensant que les résultats défectueux obtenus avec les acides métaphosphorique et tungstique étaient dus à l'acidité des filtrats, nous avons essayé de les neutraliser par la soude ou le carbonate de chaux, mais sans réussir à obtenir des chiffres satisfaisants.

Notons, en outre, que le filtrat obtenu par l'acide trichloracétique

cétique se prête très bien directement au dosage par l'azotate d'argent en présence de chromate de potassium (Mohr).

Dans ce cas, le nombre *n* de solution d'azotate d'argent à 29 gr. 06 diluée au 1/5 exprime directement la quantité de chlorure de sodium par litre, si on opère sur 2^{cc} de filtrat étendus d'un peu d'eau et additionnés d'une forte pincée de carbonate de chaux.

Comme on le voit, les chiffres obtenus avec les liquides traités par les acides metaphosphorique et tungstique, s'éloignent du titre réel de la solution. Le terme de la réaction est, en effet, très difficilement appréciable. Bien avant que l'on ait ajouté la quantité théorique de solution de sulfocyanure d'ammonium, apparaît une coloration rouge peu persistante. Il faut ensuite continuer l'addition de sulfocyanure pour obtenir une coloration stable quelques instants, et cette persistance est encore fonction de l'agitation plus ou moins vive communiquée au liquide. Les liquides obtenus ainsi sont donc inutilisables pour le dosage des chlorures.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ A							
	Méthode Laudat		Acide Tungstique		Acide Metaphosphorique et S^{64}H^3		Acide Trichloracétique (Charpentier)	
	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM
Mouton	5 gr. 1	5 gr. 9			3 gr. 6	5 gr.	5 gr. 1	6 gr.
Mouton	5 gr. 4	5 gr. 9			4 gr. 6	5 gr.	5 gr. 8	6 gr. 1
Bœuf	5 gr.	5 gr. 6			4 gr. 1	5 gr. 2	5 gr. 3	5 gr. 9
Veau	4 gr. 95	6 gr. 05			4 gr.	4 gr. 9	4 gr. 5	5 gr. 7
Veau	5 gr. 15	5 gr. 9			3 gr. 2	4 gr. 6	5 gr. 2	5 gr. 9
Mouton	5 gr. 4	6 gr. 3			4 gr. 2	4 gr. 9	5 gr. 4	6 gr. 6
Veau	5 gr. 2	5 gr. 45	4 gr. 3	4 gr. 3	4 gr. 5	5 gr.	5 gr. 2	5 gr. 7
Veau	5 gr. 15	5 gr. 7	4 gr. 7	5 gr. 6	4 gr. 5	5 gr. 6	5 gr. 3	5 gr. 8
Mouton	5 gr. 6	6 gr. 6	5 gr. 3	6 gr. 2	4 gr. 2		5 gr. 4	6 gr. 6
Mouton	5 gr. 5	6 gr. 5	4 gr. 7	6 gr. 4			5 gr. 7	6 gr. 55
Bœuf	5 gr. 3		4 gr. 9		5 gr. 2			
Porc	5 gr. 2		5 gr. 1		5 gr. 2			
Mouton	5 gr. 3		5 gr. 2		5 gr.			
Porc	5 gr.		4 gr. 2		4 gr. 5			
Mouton	5 gr. 2		4 gr. 8		5 gr.			
Mouton	5 gr.		5 gr. 5		5 gr. 4			

L'acide trichloracétique, par contre, donne un filtrat avec lequel le dosage des chlorures peut se faire de façon satisfai-

sante. (1) C'est d'ailleurs ce que montrera la comparaison des dosages effectués sur des liquides sanguins par ces trois méthodes et par celle de Laudat.

Ayant remarqué que le liquide sanguin désalbuminé avec l'acide métaphosphorique restait colore en brun, nous avons essayé d'y remédier en remplaçant 1^{re} d'acide sulfurique à 1 p. 10 par 1^{re} d'acide azotique. Mais ces essais ne nous ont pas fourni de meilleurs résultats. Le liquide filtré n'était pas plus clair et les résultats obtenus n'étaient pas meilleurs que ceux notés avec l'acide sulfurique seul, ainsi qu'on le voit sur le tableau suivant.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ PAR					
	Méthode Laudat		Acide Metaphosphorique et $\text{SO}^4 \text{H}^2$		Acide Metaphosphorique et $\text{SO}^4 \text{H}^2$ et $\text{NO}^3 \text{H}$	
	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM
Mouton	5 gr. 4	5 gr. 9	4 gr. 6	5 gr.	4 gr. 3	4 gr. 9
Bœuf	5 gr.	5 gr. 6	4 gr. 1	5 gr. 2	3 gr. 9	4 gr. 2
Veau	5 gr. 1	5 gr. 90	3 gr. 2	4 gr. 6	4 gr. 4	5 gr. 8
Veau	4 gr. 95	6 gr. 05	4 gr.	4 gr. 9	3 gr.	5 gr. 2
Mouton	5 gr. 4	6 gr. 3	4 gr. 2	4 gr. 9	4 gr. 9	6 gr. 5
Veau	5 gr. 2	5 gr. 45	4 gr. 5	5 gr.	4 gr. 5	5 gr.
Veau	5 gr. 1	5 gr. 7	4 gr. 5	5 gr. 6	4 gr. 7	5 gr. 5
Mouton	5 gr. 6	6 gr. 6	4 gr. 2		5 gr. 3	6 gr. 5

Nous avons voulu voir alors si les résultats seraient meilleurs en déféquant le sang par les acides tungstique ou métaphosphorique, de façon à diluer le sang au dixième. On aurait ainsi des liquides clairs se prêtant à la fois au dosage des chlorures et du glucose, comme on le verra plus loin.

Dans ce but, nous avons procédé aux essais suivants :

Désalbumination à l'acide tungstique

(TECHNIQUE Folin et Wu).

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution de tungstate de soude à 10 p. 100.

(1) RODILLON est arrivé aux mêmes conclusions que nous. — Dosage des chlorures dans le sang. — *Presse médicale* (31 Janvier 1920).

b) Solution d'acide sulfurique 2/3 N obtenue en prenant deux volumes d'acide sulfurique N et 1 volume d'eau distillée.

B. — TECHNIQUE.

Dans un tube à essai, mesurer 1^{cc} de sang ou de sérum et 7^{cc} d'eau distillée, mélanger, ajouter 1^{cc} de solution de tungstate de soude à 10 p. 100 et 1^{cc} d'acide sulfurique 2/3 N. Agiter à plusieurs reprises, pendant au moins 15 minutes. Filtrer sur un petit filtre sans plis, disposé sur un entonnoir de Joulie, à filtration rapide, ou bien centrifuger. Le liquide obtenu représente le sang dilué à 1 p. 10.

Désalbumination à l'acide métaphosphorique ⁽¹⁾

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution de métaphosphate de soude à 0 gr. 60 p. 100, faite à froid.

b) Solution d'acide sulfurique à 1/20 en volume.

B. — TECHNIQUE.

Dans un tube à essai, mesurer 1^{cc} de sang ou de sérum, 8^{cc} de solution de métaphosphate de soude, mélanger et ajouter 1^{cc} d'acide sulfurique à 1 p. 20. Agiter à plusieurs reprises et filtrer ou centrifuger au bout de 15 minutes au moins, comme il a été dit pour la désalbumination à l'acide tungstique. Le liquide obtenu correspond à un sang dilué à 1 p. 10.

Désalbumination à l'acide trichloracétique

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

Solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100.

B. — TECHNIQUE.

Dans un tube à essai, mesurer 3^{cc} de sang ou de sérum et 27^{cc} de solution d'acide trichloracétique. Agiter à plusieurs reprises et filtrer ou centrifuger au bout de quinze minutes au moins, comme il a été dit plus haut.

Pour le dosage par les méthodes précédentes, prendre 20^{cc} de liquide filtré, représentant 2^{cc} de sang ou de sérum et opérer comme il a été dit au début pour la désalbumination par l'acide

(1) L'acide métaphosphorique a déjà été employé pour la désalbumination du sang, par CHASSAIGNE, LABAT et CHELLE.

tungstique. On calculera aussi d'une façon identique, la quantité de chlorures.

Nous avons tout d'abord expérimenté ces procédés de désalbumination sur des solutions titrées de chlorure de sodium, traitées comme s'il s'agissait d'un sang. Les dosages ont été effectués par la méthode Charpentier, en opérant sur 20^{cc} de solution et employant la solution d'azotate d'argent à lecture directe à 1/5.

TITRE DE LA SOLUTION	CHLORURES TROUVÉS-		
	SOLUTION TRAITÉE PAR		
	Acide Métaphosphorique	Acide Tungstique	Acide Trichloracétique
5 %	4 gr. 9	4 gr. 3	4 gr. 9
5 %	4 gr. 9	4 gr. 4	4 gr. 9

Les résultats obtenus avec les acides metaphosphorique et trichloracétique, à la dilution ci-dessus, sont donc assez satisfaisants et on pourrait utiliser à la rigueur les liquides désalbuminés par ces acides. Avec le liquide déféqué par l'acide tungstique, le virage est indécis, les résultats médiocres : on en jugera, en outre, par les chiffres obtenus en opérant sur du sang ou du sérum.

SANG DE	SANG DÉSALBUMINÉ PAR					
	Méthode Laudat		Acide Tungstique		Acide Métaphosphorique	
	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM
Porc	5 gr.		5 gr.		4 gr. 7	
Mouton	5 gr. 3				5 gr. 15	
Mouton	5 gr. 6	6 gr. 4			5 gr. 4	5 gr. 9
Veau	5 gr. 4	6 gr. 1			5 gr. 2	6 gr. 1

Enfin, l'acide picrique a été utilisé par Derrien et Tatimenko, comme on le verra plus loin, pour désalbuminer le sang, en vue d'y doser les chlorures par la méthode de Mac Lean et Van

Slyke. Le filtrat obtenu avec la technique de Derrien se prête aussi fort bien au dosage par la méthode de Charpentier ⁽¹⁾ et même par la méthode de Mohr, comme nous allons le montrer.

Dosage des Chlorures après désalbumination par l'acide picrique

A. — DÉSALBUMINATION (technique de Derrien).

1° — RÉACTIFS NÉCESSAIRES.

a) Solution d'acide picrique saturée.

b) Acide acétique crist. à 1/2.

2° — TECHNIQUE.

Dans un tube à essai, mesurer, à l'aide d'une pipette à un trait 3^{cc} de sang ou de sérum, 22^{cc} 5 de solution picrique et 3 gouttes d'acide acétique à 1/2, compléter à 30^{cc} avec de l'eau distillée. Agiter vivement, filtrer ou centrifuger.

Le liquide obtenu représente le sang dilué à 1 p. 10.

B. — DOSAGE.

Le dosage peut s'effectuer par la méthode Charpentier et la méthode Mohr, toutes deux donnent des résultats superposables.

1° MÉTHODE CHARPENTIER.

Prendre 20^{cc} du liquide clair, ajouter 10^{cc} de solution d'azotate d'argent à 29 gr. 06 par litre diluée à 1/5, 3^{cc} d'acide azotique pur et 5^{cc} de solution d'alun de fer à 5 p. 100. Ajouter la solution de sulfocyanure correspondant à l'azotate d'argent jusqu'à coloration rouge persistante, soit n^{cc} employés.

2° MÉTHODE MOHR.

Prendre 20^{cc} de liquide clair, ajouter quelques gouttes de solution saturée de chromate de potassium et la solution d'azotate d'argent à 29 gr. 06 p. 1.000 étendue à 1/5. Le nombre n de cc employé correspond au nombre de grammes de chlorures contenus dans 1 litre de sang.

Dans les deux cas, la coloration jaune ne gêne pas pour percevoir les virages et les chiffres obtenus sont absolument identiques à ceux fournis par la méthode de Laudat. Nous les indiquerons dans un tableau suivant.

Pour terminer, il nous reste à parler de la méthode de Mac

(1) RAPPELEYE — J. BIOL. Chem. 1918. xxxv, p. 509.

Lean et Van Slyke ⁽¹⁾, dont il est souvent question, tant dans les journaux étrangers que français.

Ici, les chlorures sont précipités encore à l'état de combinaison argentique, mais le dosage de l'azotate d'argent en excès repose sur le principe suivant : si, dans une solution d'azotate d'argent, additionnée de citrate de soude, d'azotite de soude et d'empois d'amidon, on verse goutte à goutte une solution d'iodure de potassium, ce dernier réagit d'abord sur le sel d'argent pour donner I Ag insoluble, puis ensuite sur l'azotite de soude. Mais l'iode mise en liberté, à ce moment, bleuit l'amidon, de telle sorte que la teinte bleue indique le terme de la réaction. On conçoit qu'en utilisant une solution d'iodure de titre connu, on puisse en déduire la dose d'azotate d'argent en excès.

Dans la technique que nous exposerons plus loin, la solution d'iodure employée est titrée de façon à correspondre à un poids conventionnel de chlorure de sodium, ce qui facilite ou supprime même les calculs.

La méthode de Mac Lean et Van Slyke a été étudiée et critiquée par Derrien et Trofimenko ⁽²⁾. Voici ce qu'en disent ces derniers :

« Le procédé de désalbumination utilisé par les auteurs américains (ac. acétique, sulfate de magnésie, bain marie, filtration à l'aide de charbon de sang « blood charcoal » donne un filtrat où le chlorure d'argent conserve l'état colloïdal. Il faut le coaguler par agitation avec de l'alcool octylique et souvent de nombreuses filtrations sont nécessaires pour obtenir un liquide limpide. La *décolloïdisation* de Cl Ag est même impossible pour certains liquides, notamment pour le plasma sanguin, les méningitiques à méningocoques traités au sérum de Dopter. C'est pourquoi nous avons recherché un autre mode de désalbumination. Nous avons trouvé que la précipitation par l'acide picrique n'avait que des avantages : 15^{cc} de solution d'acide picrique saturé et deux gouttes d'acide acétique à 1/2 pour 2^{cc} de plasma sanguin dans une fiole jaugée de 200^{cc}. Le reste de la technique est celle des auteurs améri-

(1) MAC LEAN et VAN SLYKE. — *The Journal of biol. Chemistry* (Juin 1915, vol. 21, p. 361).

(2) DERRIEN et TROFIMENKO. — *Société chimique de France*, section de Montpellier (27 Avril 1917).

» cains. On élimine ainsi avec l'albumine d'autres substances
 » gênantes que n'écarte pas la désalbumination par la chaleur.
 » L'opération a l'avantage de se faire à froid, de donner un
 » liquide, où Cl Ag se coagule immédiatement et reste en milieu
 » jaune à l'abri de la lumière, et qui filtre absolument limpide,
 » à la première filtration. La filtration de l'excès d'argent par
 » l'iodure de potassium, après addition du réactif citrate-nitrite-
 » amidon de MAC LEAN et VAN SLIKE, donne les mêmes résul-
 » tats que sans acide picrique. »

Cependant, ce n'est pas cette technique que nous avons expérimenté, mais une simplification due à DONALD, VAN SLIKE et JOHN DONBAY (1). Ces auteurs, à la suite de DERRIEN et TRÖFIMENKO, qu'ils n'ont garde de citer, emploient à leur tour l'acide picrique ; mais ils l'associent à l'azote d'argent, de telle sorte qu'on précipite, en une seule opération, l'albumine et les chlorures.

Les auteurs américains donnent la formule suivante pour le réactif picro-argentique :

Azotate d'argent.....	5 gr. 812
Acide azotique (D : 1.40).....	250 cc
Acide picrique	7 gr. 50
Eau distillée.....	Q. S. pour 1.000 cc

Nous n'avons pas pu exécuter cette formule, car la quantité d'acide picrique prescrite ne peut se dissoudre intégralement, même à chaud. Après quelques essais, nous avons adopté alors le réactif suivant :

On fait deux solutions :

A) Azotate d'argent	5 gr. 812
Acide azotique (D : 1.40).....	250 cc
Eau distillée.....	Q. S. pour 1.000 cc
B) Acide picrique	7 gr. 50
Eau distillée.....	Q. S. pour 1 000 cc

On mélange ces deux solutions A et B et on a le réactif picro-argentique désiré.

Pour la pratique du dosage, les réactifs nécessaires sont, dès lors, les suivants :

(1) DONALD, VAN SLIKE et JOHN DONBAY. — A simplification of the Mac Lean Van Slyke method for détermination of plasma chlorides. — *The Journal of Biol Chemis try* (t. 37, p. 551-1919).

A) *Réactif picro-argentique* (formule personnelle indiquée plus haut).

B) *Réactif citrate-amidon.*

Citrate de soude, 5 aq..... 446 gr.

Azotite de soude..... 20 gr

Amidon soluble..... 2 gr. 50

L'amidon est dissous d'abord dans 500^{cc} d'eau bouillante, on ajoute le citrate et le nitrite, puis, après solution, on complète à 1 litre.

4^{cc} de cette solution renferment assez de citrate pour réagir avec 1^{cc} d'acide azotique, la solution résultant ayant l'acidité optima pour que la réaction bleue terminale se produise.

Quand on emploie de l'amidon ordinaire, il faut le faire bouillir une heure avec l'eau avant l'addition de citrate et de nitrite.

C) *Solution d'iodure de potassium titrée.*

Iodure de potassium pur..... 2 gr. 27

Eau distillée..... Q. S. pour 1.000^{cc}

1^{cc} de cette solution correspond à 0^{mmg.} 8 de chlorure et 2^{cc} 5 doivent correspondre à 2^{cc} du réactif picro-argentique ; il est urgent d'en vérifier le titre comme suit :

TITRAGE DE LA SOLUTION D'IODURE DE POTASSIUM

Dans un vase à précipité, on met 10^{cc} de réactif picro-argentique, 5^{cc} de solution citrate-amidon et on ajoute goutte à goutte, avec une burette, la solution d'iodure de potassium jusqu'à coloration bleue. On doit en employer 12^{cc} 65, soit 12^{cc} 5, quantité théorique, plus 0^{cc} 15 pour le virage.

TECHNIQUE DU DOSAGE DES CHLORURES DANS LE SANG

Mettre 2^{cc} de sang oxalaté ou de sérum dans un matras jaugé de 50^{cc} à moitié plein d'eau, ajouter 20^{cc} de réactif picro-argentique et on complète à 50^{cc}. Attendre cinq minutes, filtrer ou centrifuger.

L'emploi de l'alcool octylétique n'est pas nécessaire pour favoriser la coagulation.

Mesurer 20^{cc} de filtrat dans un vase d'Erlenmeyer, ajouter 4^{cc} de solution citrate-amidon et, goutte à goutte, la solution d'iodure de potassium jusqu'à coloration bleue.

La quantité de chlorures exprimés en Cl Na, et en grammes

par litre, est donnée en retranchant de 10.15 le nombre de centimètres cubes n de solution d'iodure de potassium employés.

En effet, 20^{cc} de filtrat représentent 0^{cc} 8 de sang et une quantité d'azotate d'argent susceptible de réagir avec 10^{cc} de solution iodurée. Soit a la valeur obtenue en retranchant de 10.15 le nombre n . Chaque centimètre cube d'iodure correspond à 0 gr. 0008 de Cl Na, $a \times 0,0008$ représente la quantité de ce sel contenu dans la prise d'essai. Pour un litre on aura :

$$\frac{a \times 0,0008 \times 1000}{0,8} = a$$

Les chiffres que l'on obtient par cette méthode sont sensiblement identiques à ceux du procédé de Laudat ou des méthodes de Mohr et de Charpentier après simple désalbumination par l'acide picrique. Le tableau ci-contre permet de comparer les résultats de ces trois méthodes.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ			
	Methode Laudat	Acide Picrique		Méthode Donald
		Procédé Mehr	Procédé Charpentier	
Bœuf	5 gr. 2	5 gr. 1	5 gr. 1	5 gr. 3
Humain	5 gr. 9			5 gr. 65
Mouton	6 gr.	5 gr. 95	6 gr. 2	6 gr. 15
Mouton	5 gr. 6	5 gr. 6	5 gr. 7	5 gr. 75
Mouton	5 gr. 4	5 gr. 4	5 gr. 2	5 gr. 50
Veau	5 gr. 5	5 gr. 6	5 gr. 2	5 gr. 55
Mouton	5 gr. 2	5 gr. 4	5 gr.	5 gr. 25
Mouton	5 gr. 3	5 gr. 6	5 gr. 3	5 gr. 50

En résumé, de l'examen de ces divers procédés de dosage des chlorures du sang, on déduit que la méthode la plus simple, la plus commode tout en donnant des résultats satisfaisants pour la clinique, est celle de Laudat, même en n'employant que 2^{cc} de sang.

Si, pour effectuer d'autres dosages, comme nous le montrons, on est amené à diluer le sang au dixième après défécation aux acides métaphosphorique ou trichloracétique, ou bien à le diluer au demi avec ce dernier acide, les liquides obtenus pourront être également utilisés pour y doser les chlorures. Nous

avons montré par des exemples que les chiffres trouvés dans ces trois cas peuvent se superposer sensiblement aux résultats obtenus avec le procédé de Laudat. Nous ne conseillons pas l'emploi de l'acide tungstique, qui donne des résultats inférieurs aux chiffres réels.

Avec les procédés de désalbumination à l'acide picrique, on obtient aussi de bons résultats, que l'on utilise le procédé de Mohr ou celui de Charpentier. La méthode de Donald exigeant des réactifs particuliers, d'une préparation délicate, bien que fournissant des chiffres exacts, ne nous paraît pas présenter d'intérêt sur les autres méthodes, à cause de sa complication.

Quoi qu'il en soit, nous avons étudié et précisé la technique de méthodes simples, permettant d'effectuer sur très peu de sang le dosage des chlorures si important pour la mesure de la rétention chlorurée⁽¹⁾ ou pour l'établissement de la constante hémoméningée de Derrien⁽²⁾.

Notons enfin un détail intéressant : toutes les fois que nous avons pratiqué le dosage des chlorures, dans le sang complet et dans le sérum correspondant, nous avons constamment trouvé des chiffres supérieurs (jusqu'à 1 gr. en plus) en faveur du sérum. Dans un résultat d'analyse, il sera donc bon de spécifier si on a opéré sur le sang total ou sur le sérum.

(¹) A. PRUCHE. — *Presse Médicale* (21 Janvier 1921, n° 4).

(²) E. DERRIEN. — Chimisme hémoméningé. — *Montpellier Médical*. T. 40, p. 171 (1918).

CHAPITRE II

Dosage du Phosphore dans le sang

Le dosage du phosphore total dans le sang ne pouvant s'effectuer qu'après destruction des matières organiques, il était inutile de faire intervenir nos réactifs de désalbumination et il importait surtout d'avoir une ou plusieurs bonnes méthodes de dosage pouvant s'appliquer à de très petits volumes de sang. Trois méthodes, déjà classiques, se sont offertes à notre choix ; ce sont elles que nous avons expérimentées et dont nous avons comparé les résultats.

La première est une méthode pondérale, la seconde est une méthode diaphanométrique, la troisième une méthode colorimétrique. La méthode pondérale est très rigoureuse, les autres, qui souvent ne donnent que des résultats approchés, sont ici d'une exactitude tout à fait satisfaisante.

La méthode pondérale de Posternak ⁽¹⁾ consiste à précipiter le phosphore d'abord sous forme de phosphomolybdate d'ammonium, puis à l'état de sulfo-phosphomolybdate de baryum ⁽²⁾ dont le poids moléculaire très élevé représente plus de 130 fois le poids de phosphore qui entre dans sa composition.

La méthode diaphanométrique repose sur le trouble que donnent l'acide phosphorique et les phosphates avec le réactif

⁽¹⁾ POSTERNAK. — *Bull. Soc. Chim. de France*, 4^e s., t. XXVII-XXVIII (1920), n^{os} 12 et 13.

⁽²⁾ $[\text{PO}_4 (\text{MoO}_4)_2]^{2-} \text{Ba}^{2+} + \text{SO}_4 (\text{MoO}_4)_2 \text{Ba}^{2+}$.

strychno-molybdique de Denigès⁽¹⁾. Enfin, la méthode colorimétrique utilise la coloration bleue, que l'on obtient en faisant réagir le chlorure stanneux sur le réactif sulfomolybdique en présence de phosphates, réaction découverte et étudiée dernièrement par G. Denigès⁽²⁾. « Elle permet de déceler jusqu'à deux dixièmes de milligramme d'acide phosphorique libre ou salifié contenus dans une prise d'essai de 5^{cc} et de donner par colorimétrie exactement et avec une grande rapidité, les moindres traces de phosphore amenées sous forme phosphorique, dans les circonstances les plus variées et notamment dans tous les produits biologiques, tant végétaux qu'animaux ». L'auteur lui a donné le nom de méthode *céruléo-molybdique*.

Comme nous l'avons dit, il faut opérer sur un liquide exempt de matières organiques et par conséquent procéder au préalable à la destruction intégrale de ces dernières.

Pour appliquer les méthodes diaphanométrie ou colorimétrie, on peut détruire la matière organique par l'incinération magnésienne (Geneuil-Portes). Mais nous avons préféré employer la méthode nitrosulfurique de Denigès, dont l'avantage est de fournir un liquide se prêtant à l'application des trois méthodes de dosage. Nous avons suivi très exactement le mode opératoire indiqué par l'auteur en l'adaptant aux circonstances.

La détermination du phosphore dans le sang comprend donc deux opérations : la destruction des matières organiques, puis le dosage de l'acide phosphorique formé.

1^o Destruction de la matière organique

Dans une petite capsule de porcelaine, mettre 2 ou 3^{cc} d'eau distillée, mesurer 1^{cc} de sang avec une petite pipette à un seul trait et les mélanger à l'eau en ayant soin d'aspirer deux ou trois fois cette dernière dans la pipette pour la laver : ajouter 1^{cc} d'acide sulfurique et 1^{cc} d'acide azotique pur, puis recouvrir

(1) DENIGÈS. — *Bulletin des Travaux de la Soc. de Pharmacie de Bordeaux* (Mai 1910).

(2) G. DENIGÈS. — C. R. 1920. t. 171, p. 802. Réaction de coloration extrêmement sensible des phosphates et des arsénates ses applications.

G. DENIGÈS. — C. R. des séances de la Société de Biologie (14 Mai 1924). — Détermination quantitative des plus faibles quantités de phosphates dans les produits biologiques par la méthode céruléo molybdique.

la capsule d'un petit entonnoir renversé. Chauffer doucement en plaçant la capsule sur une rondelle d'amiante, l'eau s'évapore, des vapeurs nitreuses apparaissent, la liqueur brunit et bientôt les vapeurs jaunes sont remplacées par des vapeurs blanches d'anhydride sulfurique. Retirer du feu, laisser refroidir, ajouter 1^{re} d'acide azotique et chauffer à nouveau jusqu'à vapeurs blanches. On renouvelle ainsi cette opération jusqu'à obtention d'un liquide incolore ou à peine coloré en jaune pâle par le fer que contient le sang ; 2 ou 3^{es} d'acide azotique au maximum suffisent pour atteindre ce résultat. Après la dernière addition, prolonger la chauffe deux ou trois minutes pour bien chasser les dernières traces d'acide azotique. Si le dosage doit être fait à l'aide de la méthode de Posternak, on additionnera d'eau distillée le liquide de destruction de façon à avoir en tout 10^{cc}. Si, au contraire, on doit employer une des deux dernières méthodes, le liquide de destruction sera porté à douce ébullition jusqu'à ce que son volume soit réduit de moitié ; on laisse refroidir et on amène le volume à 200^{cc}, avec de l'eau distillée. Cette ébullition est absolument nécessaire, elle a pour but d'amener à l'état d'acide phosphorique une petite quantité d'acide métaphosphorique qui s'est formé dans le liquide de destruction.

2° Méthode pondérale

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

- a) Solution de molybdate d'ammonium à 10 p. 100 ;
- b) Liqueur molybdique ordinaire. Faire une solution aqueuse à 15 p. 100 de molybdate d'ammonium chimiquement pur, la chauffer vers 90 degrés et la verser dans un égal volume d'un mélange à parties égales d'eau et d'acide azotique officinal ($D = 1.40$) ;
- c) Solution de sulfate d'ammoniaque chimiquement pur à 20 p. 100 ;
- d) Solution de nitrate d'ammonium pur à 5 p. 100 ;
- e) Solution de chlorure de baryum chimiquement pur à 10 p. 100 ;
- f) Solution d'ammoniaque à 10 p. 100 exempte de gaz carbonique.

B. — TECHNIQUE.

Pour sa description, nous utiliserons les termes mêmes de l'auteur. « Les 10^{cc} obtenus, comme il a été dit plus haut, après « destruction de la matière organique, sont placés dans un « verre de Bohême de 100^{cc} environ et chauffés avec 10^{cc} de « sulfate d'ammonium à 20 p. 100 jusqu'à ébullition ; on pose le « verre sur quelques doubles de papier pour empêcher l'éclate- « ment et on y verse 5^{cc} de molybdate d'ammonium. Pour avoir « un précipité cristallin, facilement filtrable. on n'agit qu'au « bout de cinq minutes en frottant les parois du verre avec une « baguette ; on agit de nouveau après un intervalle de cinq « minutes. En procédant ainsi, la précipitation est complète en « quinze minutes. Il est loisible de laisser le mélange au repos « plus longtemps. »

Filtration et lavage du phosphomolybdate d'ammonium. — On filtre sur des filtres ronds de 4 centimètres de diamètre, découpés dans du papier pour analyse dense. La liqueur est recueillie dans un ballon de 100^{cc} bien propre. Si elle est trouble, on la repasse sur le filtre en ayant soin de mettre en suspension le petit dépôt jaune qui se forme au fond du ballon.

Lorsque le filtre est bien égoutté, on lave avec du nitrate d'ammonium à 5 p. 100. C'est l'opération essentielle dont dépendra principalement l'exactitude du dosage. On arrose soigneusement toutes les parties du verre avec 7 à 8^{cc} de nitrate. Après avoir mis en suspension le précipité et l'avoir laissé se déposer, on décante le liquide sur le filtre, en le remplissant jusqu'au bord. Cinq lavages suffisent pour débarrasser le précipité du molybdate en excès et aussi de sulfate.

Dissolution du phosphomolybdate d'ammonium. — Elle s'opère dans le verre qui a servi pour la précipitation. On commence par dissoudre le précipité entraîné sur le filtre, en remplissant ce dernier d'ammoniaque et en le lavant quatre fois avec de l'eau distillée.

L'ammoniaque et l'eau de lavage sont recueillis dans le verre placé au-dessous de l'entonnoir. Pendant la filtration, l'entonnoir et le verre, autant que possible, sont couverts au moyen de verres de montre. Le précipité resté dans le verre est dissous dans le liquide filtré, les particules adhérentes aux parois étant entraînées par un mince filet d'eau. La solution, dont le volume

ne dépasse pas 15 à 20^{cc} est prête pour être précipitée avec du chlorure de baryum.

Précipitation et filtration du phosphomolybdate de baryum. — On verse dans la solution ammoniacale du chlorure de baryum à 10 p. 100 en excès : on en prend 2^{cc} jusqu'à 2 milligrammes de phosphore ⁽¹⁾ et 5^{cc} de 2 à 5 milligrammes de phosphore. La précipitation est complète au bout de quinze minutes à condition d'agiter deux fois avec un intervalle de cinq minutes en frottant les parois du verre avec la baguette de verre.

Filtrer le sel de baryte au bout d'un quart d'heure sur un filtre sans cendres de 5 centim. 1/2 de diamètre en mettant chaque fois en suspension le précipité. Laver rapidement le verre et le filtre à l'eau distillée, à trois reprises. On détache alors le précipité adhérent au verre, sous un peu d'eau au moyen d'une baguette dont le bout est garni d'un caoutchouc. Pendant la filtration, le verre et l'entonnoir restent couverts de leurs verres de montre. En un mot, on prend toutes ces précautions pour empêcher la formation de carbonate de baryte.

Séchage et calcination du précipité. — On sèche et brûle le filtre contenant le précipité barytique dans un creuset de platine ⁽²⁾ incliné, avec les précautions d'usage. On pèse après refroidissement. Le poids en grammes trouvé, multiplié par 0 gr. 00739 donne la quantité de phosphore contenue dans la prise d'essai. En multipliant par 1000, on obtient la quantité de phosphore par litre de sang. Le même poids trouvé multiplié par le produit $7,39 \times 2,29 = 1,69231$ indique le poids de phosphate pour 1000^{cc} de sang exprimé en P^2O^5 .

Pour les méthodes diaphanométrique et colorimétrique, des solutions étalons d'acide phosphorique sont nécessaires. On les prépare comme suit :

Solutions étalons d'acide phosphorique. — On fait une solution de phosphate monoammonique à 1 gr. 62 par litre, correspondant à 1 gramme de P^2O^5 par litre. Ou bien on peut diluer à moitié la solution de phosphate disodique à 2 grammes par litre de P^2O^5 qui sert à titrer la liqueur d'urane employée dans

(1) 2^{cc} suffisent presque toujours pour le dosage dans le sang.

(2) A défaut de creuset de platine on peut employer un creuset de silice.

l'analyse des urines. Chaque centimètre cube de cette solution contient 1 milligramme de P^2O^5 .

A l'aide de cette liqueur titrée, on prépare une série de dilutions correspondant à 1 milligramme, 2 milligrammes... jusqu'à 12 milligrammes de P^2O^5 par litre.

Pour cela, dans un ballon jaugé de 100^{cc} on introduit 0^{cc} 1, 0^{cc} 2, 0^{cc} 3... 1^{cc} 2 de la solution à 1 gramme pour 1000 et on complète à 100^{cc} avec de l'eau distillée. On a ainsi des solutions qui contiennent 1, 2, 3 milligrammes... 12 milligrammes de P^2O^5 par litre. On conserve ces solutions dans des flacons bien bouchés.

3° Méthode diaphanométrie

Cette méthode a déjà été utilisée par PORTE (1). Nous l'avons étudiée à notre tour et nous en avons modifié les détails en vue de lui donner une exactitude plus grande.

L'auteur, en effet, détruisait la matière organique par incinération magnésienne de la façon suivante : « A l'aide d'une » pipette de Levaditi graduée en 100^{me} de centimètre cube, on » prélève 0^{cc} 05 de sang ; on l'introduit directement dans un tube » de quartz en enfonçant suffisamment la pipette pour que le » liquide soit réuni en entier au fond du tube et qu'aucune » portion ne reste adhérente aux parois ; on lave la pipette » avec un peu d'eau distillée. On ajoute trois gouttes d'une » solution d'azotate de magnésie à 50 p. 100 ; on évapore sur la » flamme d'un bec Bunsen avec précaution pour éviter la pro- » duction de mousse et on calcine jusqu'à obtention de cendres » blanches. On refroidit et on met dans le tube 5^{cc} d'une solu- » tion d'acide azotique à 2 p. 100. Tout se dissout par agita- » tion ».

Nous avons suivi exactement cette technique, mais dans certains cas, nous n'avons pu obtenir de cendres blanches qu'en augmentant de beaucoup la quantité d'azotate de magnésie indiquée. Le résidu obtenu dans ces conditions n'était pas complètement soluble dans les 5^{cc} d'acide azotique à 2 p. 100. C'est pour cette raison et aussi pour éviter l'usage d'un tube de quartz que nous avons adopté la destruction sulfo-nitrique qui a l'avan-

(1) A. PORTE. *Contribution à l'étude de la phosphatémie*. (Thèse de médecine, Bordeaux, 1914).

tage de ne pas introduire de magnésie dans le produit de destruction et de fournir un liquide sur lequel on peut, comme nous l'avons dit, pratiquer indifféremment soit la méthode pondérale, soit la méthode céruléomolybdique.

Nous n'avons pas également adopté le même mode de préparation de la gamme des étalons. Porte, en effet, prépare, à l'aide d'une solution titrée de phosphates, une série de dix tubes contenant respectivement 10, 11, 12 milligr... 20 milligr. (1). A 1^{cc} d'étalon, il ajoute 5^{cc} de réactif strychno-nitro-molybdique et obtient ainsi des troubles très prononcés, ce qui rend la comparaison difficile. De même, pour les proportions de réactif strychno-molybdique à faire réagir sur la solution phosphatée, nous n'avons pas suivi la technique de Porte, mais bien celle de Deniges, qui exige une moins grande quantité de réactif. Pratiquement, les réactifs suivants sont nécessaires :

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solutions titrées de phosphate indiquées plus haut.

b) Réactif strychno-nitro-molybdique. Dissoudre dans 20^{cc} d'eau chaude 0 gr. 50 de sulfate de strychnine pur. On ajoute ensuite 50^{cc} d'eau froide et 10^{cc} d'acide azotique et 10^{cc} de réactif de Sonnenschein et Eggert obtenu en faisant dissoudre quinze grammes de molybdate d'ammoniaque dans de l'eau tiède, complétant à 100^{cc} avec de l'eau froide et versant ce liquide dans 100^{cc} d'acide azotique officinal dilué d'eau à moitié.

Le réactif strychnomolybdique est ensuite complété à 100^{cc} avec de l'eau. S'il était trouble, on le décanterait. Sa couleur, jaune clair au début, passe au jaune foncé, puis revient au jaune clair au bout de quinze jours, il peut être alors employé.

B. — PRÉPARATION DE LA GAMME :

Choisir treize tubes à essais de même calibre. Dans chacun des douze premiers mettre respectivement 1^{cc} de solution phosphatée à 1, 2, 3 .. 12 milligrammes de P^2O^5 , puis 4^{cc} d'eau distillée et trois gouttes d'acide azotique pur. Dans le treizième tube on met 1^{cc} de liquide de destruction dilué à 1/200 et bouilli (2) 4^{cc} d'eau distillée et trois gouttes d'acide azotique. Enfin, dans les treize tubes, on verse 1^{cc} de réactif strychno-nitro-molybdique

(1) Loc. cit., page 46.

(2) Nous indiquerons plus loin les raisons qui obligent à le porter à l'ébullition.

et on agite ; au bout de dix minutes, on compare le trouble obtenu dans le treizieme tube avec les troubles de l'échelle et on note celui dont il se rapproche le plus. En multipliant par 200 la dose d'acide phosphorique de l'étalon, on obtient la quantité de phosphore exprimée en P_2O_5 contenue dans un litre de sang. En effet, supposons que le sang donne un trouble identique à l'étalon de 9 milligrammes, nous dirons que le sang contient 1 gr. 80 de P_2O_5 par litre. En opérant ainsi, les troubles obtenus sont plus légers qu'avec la technique de Porte, et, par suite, plus facilement comparables.

4° — Méthode céruléomolybdique de Deniges

La coloration bleue obtenue par l'action du chlorure stanneux sur le réactif sulfomolybdique en présence de phosphates ne se produit et n'atteint son maximum qu'en employant les quantités exactes de ces réactifs indiquées par G. Deniges, ainsi que nous nous en sommes rendu compte. Il y aura donc lieu de suivre exactement la technique indiquée ci-dessous pour opérer en milieu acide optimum et pour què les résultats ne soient pas faussés par la formation d'autres colorations bleues ne provenant pas des phosphates.

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES.

a) Solutions titrées de phosphate indiquées plus haut.

b) *Réactif sulfomolybdique*. — Mélanger volumes égaux d'acide sulfurique pur et d'une solution aqueuse à 10 p. 100 de molybdate d'ammonium.

c) *Chlorure stanneux*. — Mettre dans un tube à essais 0 gr. 10 de papier d'étain, 2^{cc} d'acide chlorydrique et une goutte d'une solution de sulfate de cuivre à 3 ou 4 p. 100. Chauffer doucement jusqu'à attaque vive qu'on rétablit en chauffant toutes les fois qu'elle se ralentit. Étendre à 10^{cc} avec de l'eau, laisser refroidir et, s'il y a un dépôt, décantier la partie claire. Ce réactif doit être renouvelé souvent.

B. — TECHNIQUE.

Prendre treize tubes à essais de même calibre ; dans chacun des douze premiers mettre 5^{cc} des solutions étalons de phosphate à 1, 2, 3 ... 12 milligrammes de P_2O_5 et dans le treizième, 5^{cc} du liquide de destruction dilué à 1/200 bouilli. Enfin, dans les

treize tubes, ajouter aussi rapidement que possible quatre gouttes de réactif sulfo-molybdique, agiter, puis deux gouttes de chlorure stanneux, agiter et examiner au bout de dix minutes. On compare la teinte du tube contenant le sang à doser avec les tubes étalons. Comme dans la méthode précédente, la dose d'acide phosphorique de l'étalon multipliée par 200 donne la quantité de phosphore exprimée en $P^{2}O^{5}$ contenue dans un litre de sang.

La méthode de Posternak donne des résultats très rigoureux à condition de suivre exactement la technique indiquée par l'auteur. Les chiffres suivants, empruntés à son travail, en sont la preuve :

PHOSPHORE en millig. dans la prise d'essai	PHOSPHORE en millig. trouvé
0 millig. 05	0 millig. 049
0 millig. 1	0 millig. 099
0 millig. 4	0 millig. 401
1 millig.	0 millig. 999
2 millig.	2 millig. 209
5 millig.	5 millig.

Nous avons nous-mêmes contrôlé la méthode de M. Posternak sur des solutions titrées d'acide phosphorique que nous avons traitées au préalable, comme le sang, par le mélange sulfonitrique à chaud et en opérant sur 1^{cc} seulement.

PHOSPHORE par litre en $P^{2}O^{5}$	PHOSPHORE par litre trouvé en $P^{2}O^{5}$
2 gr.	2 gr. 05
0 gr. 75	0 gr. 747

Cette méthode donne donc toute sécurité, c'est elle qu'il faudra employer toutes les fois qu'on désirera un dosage parfait. Elle est de technique facile et relativement rapide pour une méthode pondérale. Elle nous a servi à contrôler les deux autres méthodes.

Au début de nos essais par les méthodes diaphanométrique et colorimétrique, comparativement avec la méthode pondérale, nous avons remarqué que les deux premières nous donnaient

toujours des résultats plus faibles. Cette constance, malgré tous les soins apportés au mode opératoire, nous a amené à penser qu'une partie du phosphore contenu dans le liquide de dosage passait sous une forme telle que les réactifs strychnomolybdique et sulfo-stanno-molybdique n'avaient aucune action sur lui. Nous avons vu, en effet, qu'en fin de destruction, en milieu sulfurique très concentré et, par suite, en milieu très déshydratant, il se forme un peu d'acide métaphosphorique. C'est pour ramener cet acide métaphosphorique à l'état d'acide phosphorique que nous portons notre liquide à l'ébullition prolongée. L'expérience nous a montré que cette transformation était complète lors que le volume du liquide était réduit de moitié, et que, cette précaution étant prise, les résultats n'étaient plus trop faibles.

Les résultats comparatifs entre les trois méthodes et ceux obtenus avec et sans ébullition pour les méthodes diaphanométrie et colorimétrie sont donnés dans le tableau suivant :

SANG	MÉTHODE				
	PONDÉRALE	DIAPHANOMÉTRIQUE		COLORIMÉTRIQUE	
		avant Ebullition	après Ebullition	avant Ebullition	après Ebullition
Mouton	0 gr. 37	0 gr. 20	0 gr. 35	0 gr. 20	0 gr. 35
humain	1 gr. 33	0 gr. 60	1 gr. 35	0 gr. 90	1 gr. 35
d°	1 gr. 06	0 gr. 80	1 gr.	0 gr. 90	1 gr.
d°	0 gr. 93	0 gr. 80	0 gr. 90	0 gr. 70	0 gr. 90
d°	1 gr. 03	1 gr.	1 gr. 10	0 gr. 80	1 gr.
d°	1 gr. 38	0 gr. 90	1 gr. 40	0 gr. 75	1 gr. 40
d°	0 gr. 75	0 gr. 70	0 gr. 75	0 gr. 75	0 gr. 75
d°	0 gr. 77	0 gr. 75	0 gr. 80	0 gr. 70	0 gr. 75
d°	0 gr. 81	0 gr. 78	0 gr. 80	0 gr. 70	0 gr. 80
d° (sérum)	0 gr. 42	0 gr. 20	0 gr. 35	0 gr. 25	0 gr. 40
d° (sérum)	0 gr. 44	0 gr. 36	0 gr. 40	0 gr. 36	0 gr. 40

On voit donc que les méthodes diaphanométrie et colorimétrie donnent des résultats très suffisants et constituent de bonnes méthodes cliniques. Notons enfin que nos déterminations nous ont donné des quantités d'acide phosphorique voisines de celles indiquées par Porte dans le sang humain. D'autre part, nous avons pratiqué ces trois méthodes sur 1^{er} de

sang ou de sérum ce qui, à notre avis, est préférable pour l'exactitude des résultats. Cependant, étant donnée leur sensibilité, rien ne s'oppose à ce qu'on opère sur des quantités moindres de sang.

Enfin, qu'on opère sur le sang complet ou sur ses différents éléments, la technique est la même.

Ajoutons avec G. Denigès que pour doser l'ion phosphorique seul dans les plasma et les humeurs, il suffit d'appliquer la méthode céruléomolybdique au produit débarrassé d'albumine par l'acide trichloracétique.

En terminant cette étude comparative de trois excellentes méthodes de dosage du phosphore dans le sang, nous ne pouvons que souscrire à cette opinion de M. G. Denigès (1) :

« Pourront être ainsi abordés et élucidés bien des points de
« physiologie et de pathologie relatifs à la statique et à la
« dynamique du phosphore organique et minéral, et que les
« techniques anciennes, insuffisamment sensibles ou trop com-
« pliquées n'avaient pas jusqu'ici permis d'atteindre. »

(1) Loc. cit. — C. R. Société de Biologie 1921

Dosage du Glucose dans le sang

Le glucose est un des constituants du sang dont le dosage a le plus préoccupé les chercheurs, comme on peut en juger par le très grand nombre de méthodes proposées. Nous n'avons pas la prétention de les décrire, même pas de les citer toutes.

Ces méthodes peuvent se diviser en deux groupes, suivant qu'on fait appel aux procédés volumétriques ou aux procédés colorimétriques.

Les méthodes du premier groupe consistent à désalbuminer le sang, à faire agir le liquide désalbuminé sur la liqueur de Fehling ou un autre réactif analogue, à recueillir l'oxyde cuivreux formé et à le doser en mesurant par le caméléon la quantité de sulfate ferrique qu'il aura pu réduire (G. Bertrand) ⁽¹⁾ ou bien elles consistent à doser l'excès de cuivre non réduit par l'iode (Lehmann), L. Grimbert ⁽²⁾. Ces méthodes ont été adaptées en vue du dosage du sucre sur de très petits volumes de sang par nombre d'expérimentateurs. Celle de Bertrand, par L. de Saint-Rat et J. Ronfaut ⁽³⁾ et par Guillaumin ⁽⁴⁾, celle de Lehmann-Grimbert, par Bang ⁽⁵⁾, etc...

⁽¹⁾ G. BERTRAND. — Manipulation de chimie biologique, p. 67 et suivantes.

⁽²⁾ L. GRIMBERT. — Dosage des sucres réducteurs par la méthode de LEHMANN, *C. R. de la Soc. de biologie* (t. 13, p. 737, 1912) et *Bull. de la Soc. chimique de France* (t. 13, p. 117, 1913).

⁽³⁾ L. DE SAINT-RAT et J. RONFAUT. — Sur le dosage de petites quantités de sucres réducteurs dans les liquides de l'organisme. *Bull. des Sciences pharmacologiques* (n° 6, Juin 1920, p. 289).

⁽⁴⁾ GUILLAUMIN. — *Journ. Pharm. et chimie* (t. 22, p. 327, 1920).

⁽⁵⁾ BANG. — Sur la micro-méthode de dosage du sucre dans le sang. *Bioch. Zeitschrift*, (t. 57, p. 300, 1913; t. 74, 1916).

D'autres auteurs ont dosé le cuivre résiduel, séparé de l'oxyde cuivreux par cupro-cyanimétrie ⁽¹⁾.

Nous n'avons pas examiné ces méthodes et, notamment, les deux premières, pour les raisons suivantes :

1° Ce sont des méthodes très exactes, dont personne, semble-il, ne discute la précision et qui ont fourni les meilleurs résultats à ceux qui les ont employées ;

2° Leur mise en œuvre nécessite l'emploi d'un dispositif spécial pour la séparation très délicate de l'oxyde cuivreux dont on doit éviter à tout prix l'oxydation ;

3° Il faut utiliser des solutions titrées, d'autant plus difficiles à conserver, qu'on les a plus diluées, en vue de microdosages. Ces difficultés sont peu de chose pour des mains exercées, dans un laboratoire bien outillé ; elles sont énormes, au contraire, dans une officine où, tout en faisant bien, il faut faire vite et sans complication.

A ce point de vue, les méthodes du second groupe sont plus séduisantes par leur simplicité d'exécution, mais elles sont encore très nombreuses, et là, il nous a fallu faire un choix. On peut les classer comme suit :

1° Méthodes dans lesquelles le glucose réduit une matière colorante en donnant un dérivé incolore, telle est la méthode de Herzfeld au bleu de méthylène ⁽²⁾ ;

2° Méthodes dans lesquelles le glucose donne des matières colorantes en milieu neutre, acide ou alcalin, avec certains réactifs : l'acide p. phénylhydrazine-sulfonique (Wacker) ⁽³⁾ le naphthol (Reicher et Stein) ⁽⁴⁾ le thymol (Chelle) ⁽⁵⁾ l'acide picrique (Lewis et Benedict) ⁽⁶⁾ ;

3° Méthodes dans lesquelles l'oxyde cuivreux formé par action du glucose sur un sel de cuivre en solution alcaline, réduit un

(1) BAUZIL et BOYER. — *Journ. de Pharm. et chimie* (t. 16, p. 171-179, 1917).

(2) HERZFELD. — *Zeitschrift für physiol. chem.* (t. 77, p. 420, 1912.)

(3) WACKER. — *Zeitschrift für physiol. chem.* (t. 67, p. 197, 1910).

(4) REICHER et STEIN. — *Biochem. Zeitschr.* (t. 37, p. 321, 1911).

(5) CHELLE. — *Bull. des trav. de la Soc. de pharm. de Bordeaux* (Mai 1914).

(6) LEWIS et BENEDICT. — *The Journ. of Biolog. chemistry* (t. 20, p. 64-72, 1915).

BENEDICT. — *Journ. of Biolog. chemistry* (t. 34, p. 203, 1918).

réactif molybdique (Folin et Wu) ⁽¹⁾ en donnant un produit coloré, ou bien reoxydé, fournit du ferrocyanure de cuivre rouge-brun (Goiffon et Nepveux) ⁽²⁾. La méthode de Herzfeld était d'une si grande simplicité d'exécution qu'elle méritait d'être étudiée ; nous avons rejeté la méthode de Wacker, qui utilise un réactif trop peu courant en pharmacie ; nous avons laissé de côté la méthode de Lewis et Benedict, bien étudiée par Derrien et Fontès ⁽³⁾ et par Neau ⁽⁴⁾, élève de Derrien. Cette méthode pouvant être en défaut lorsque le sang contient un excès de créatinine ; enfin, nous avons étudié et comparé les méthodes de Folin et Wu, de Goiffon et Nepveux et celle de Chelle.

I. — Méthode de Herzfeld

Cette méthode repose sur le principe suivant : Si dans une solution de glucose, chaude et alcalinisée, on fait tomber goutte à goutte une solution de bleu de méthylène, ce dernier est décoloré au fur et à mesure. Dès que tout le glucose est entré en réaction, le bleu de méthylène reste intact et conserve sa coloration. La réaction serait quantitative et permettrait de déduire la quantité de glucose mis en œuvre du volume de solution titrée de bleu de méthylène employé. Un procédé aussi simple méritait d'être vérifié. Voici d'abord le mode opératoire indiqué par Herzfeld.

A. — SOLUTIONS NÉCESSAIRES :

a) Solution aqueuse de bleu de méthylène à 1 p. 100.000.

b) Lessive de potasse à 20 p. 100.

c) Solution à 10 p. 100 d'acide métaphosphorique.

d) Solution à 0 gr. 1 p. 100 de bleu de méthylène.

Pour obtenir la solution de bleu de méthylène à 1 p. 100.000, on fait une solution exacte de bleu de méthylène à 0 gr. 1 p. 100,

(1) FOLIN et WU. — *Journ. Biol. chemis* (t. 38, p. 106, 1919).
do do do do (t. 41, p. 367, 1920).

(2) GOIFFON et NEPVEUX. — *C. R. soc. Biolog.* (t. 83, p. 121-1920).

(3) DERRIEN et FONTÈS. — *Bull. de la Soc. chim. de France* (t. 27, p. 327, 1920).

(4) NEAU. — *Nouvelles méthodes américaines de dosage colorimétrique de glucose* (Thèse de médecine, Montpellier, 1920).

on en prend 1^{cc} et on amène à 100^{cc} avec de l'eau distillée, on a ainsi la solution désirée.

B. — TECHNIQUE.

A une quantité exactement mesurée de solution de glucose à 0 gr. 1 p. 100, on ajoute 0^{cc} 5 de potasse à 20^{cc} p. 100. On chauffe avec précaution dans une capsule de porcelaine blanche sur une petite flamme presque jusqu'à ébullition. Dès que le liquide chaud commence à se colorer en jaune, on fait couler avec précaution à l'aide d'une burette, le long de la paroi du vase, la solution de bleu de méthylène ci-dessus ; la source de chaleur est écartée et on évite d'agiter. Lorsqu'une dernière goutte ne se décolore pas, après agitation, avec une baguette de verre, la réaction est terminée.

On détermine ainsi la quantité de solution de bleu de méthylène que décolore la prise d'essai de solution glucosée. Par exemple, si la prise d'essai renferme 0 gr. 001 de glucose et qu'elle décolore 1^{cc} 6 de solution de bleu, 1^{cc} de solution de bleu correspond à 0 gr. 000625 de glucose.

Dosage du glucose dans le sang. — 3 à 5^{cc} de sérum frais ou de sang sont mélangés à 3 parties d'acide métaphosphorique à 10 p. 100 ; on agite ; après 10 minutes de contact, on filtre, et le précipité est lavé avec un peu d'acide métaphosphorique. Le filtrat clair est neutralisé avec de la potasse à 20 p. 100 et on y ajoute encore 0^{cc} 5 de potasse.

On chauffe comme il a été dit plus haut et, après l'apparition d'une teinte jaune, on titre jusqu'à coloration bleue légère.

Soit 2^{cc} 8 de sang employés et 2^{cc} 9 de bleu de méthylène versés ; la quantité de glucose dans la prise d'essai sera de $\frac{2^{cc} 9}{2^{cc} 8} \times 0.000625 = 0 \text{ gr. } 0006437 \text{ et } 0 \text{ gr. } 06438 \text{ p. } 100.$

Pour vérifier l'exactitude de cette méthode, nous avons tout d'abord opéré sur une solution aqueuse de glucose à 1 p. 1000, dont nous avons pris des quantités croissantes et que nous avons traitée suivant la technique ci-dessus.

Nous avons constaté que la disparition de la teinte bleue ne se produisait pas toujours facilement sans agitation, même au début. D'autre part, la fin de la réaction est très difficile à saisir. La réaction s'effectue quantitativement assez mal et il n'y a pas exactement proportionnalité entre les quantités de bleu de

méthylène employé et les quantités de glucose, ainsi qu'on peut s'en rendre compte par le tableau suivant :

SOLUTION GLUCOSÉE à 1 p. 1000	SOLUTION DE BLEU DE MÉTHYLÈNE	
	NOMBRE DE CENTIMÈTRES CUBES EMPLOYÉS	
	Premier Dosage	Deuxième Dosage
1 cc	0 cc 35	0 cc 4
2 cc	0 cc 7	0 cc 7
3 cc	1 cc	1 cc 1
4 cc	1 cc 6	1 cc 9
5 cc	2 cc 4	2 cc 2
10 cc	6 cc 6	6 cc 2
15 cc	8 cc 9	9 cc
20 cc	11 cc 8	12 cc 4

D'un autre côté, la dilution de la solution de glucose a une grande influence sur le dosage.

En effet, nous avons traité 1^{cc} de solution de glucose à 1 p. 1000 avec 0^{cc} 5 de potasse, suivant la technique, nous avons employé 0^{cc} 35 de solution de bleu de méthylène. 1^{cc} de la même solution de glucose additionnée de 0^{cc} 5 de potasse est diluée avec 5^{cc} d'eau distillée, la coloration en bleu a lieu dès la première goutte de bleu de méthylène ajoutée.

Cette méthode, si séduisante en apparence, ne présente donc aucune garantie d'exactitude ; nous l'avons donc rejetée sans hésitation.

II. — Méthode de Folin et H. Wu

Nous abordons ici l'étude d'une méthode qui, rapidement connue et appréciée, a fait, peut-on dire, le tour du monde. Nombre d'auteurs l'ont essayée et modifiée à leur gré ; à notre tour, nous apportons sur cette question, le fruit de nos recherches et de notre expérience.

Le principe de cette méthode est le suivant : Le sang est désalbuminé à l'acide tungstique ; on fait agir le filtrat obtenu sur un réactif cuivrique analogue à la liqueur de Fehling ; l'oxyde cuivrique formé, dissous dans un réactif acide à base

d'acide tungstique et molybdique, développe une coloration bleue proportionnelle à la quantité d'oxyde cuivreux et, par suite, à la dose de glucose qui lui a donné naissance. Il s'en suit, qu'en procédant de façon identique avec des solutions étalons de glucose, on pourra, à l'aide de la méthode colorimétrique, connaître la quantité de glucose contenue dans le sang. Nous nous sommes demandé, à cette occasion, comme d'autres auteurs d'ailleurs, si l'on ne pourrait pas aussi désalbuminer le sang par d'autres réactifs, tels que les acides trichloracétique, métaphosphorique, picrique, ce qui permettrait d'effectuer le dosage du glucose sur les liquides qui peuvent servir au dosage des chlorures.

Nous allons exposer le résultat de nos recherches dans cette voie et nous suivrons pour cela l'ordre même des opérations à effectuer : la désalbumination du sang, la réduction du réactif cuivrique et le dosage colorimétrique.

I. — DÉSALBUMINATION DU SANG

La désalbumination au 1/10^e de ce liquide par les acides tungstique, métaphosphorique, trichloracétique et picrique, s'effectuant avec les mêmes réactifs et suivant les mêmes techniques que pour la défécation du sang à 1 p. 10, en vue du dosage des chlorures, on se reportera à cet article.

RÉDUCTION ET DOSAGE

Quelque soit le mode de désalbumination utilisé, le réactif cuivrique et tartrique ainsi que le réactif tungsto-molybdique sont les mêmes ; aussi, allons-nous en donner immédiatement la composition.

A. — RÉACTIF CUIVRIQUE :

Dissoudre 40 grammes de carbonate de soude anhydre dans environ 400^{cc} d'eau et introduire cette solution dans un flacon de un litre. Ajouter 7 gr. 50 d'acide tartrique, et, quand celui-ci est dissous, ajouter 4 gr. 50 de sulfate de cuivre cristallisé. Mélanger, compléter le volume à 1 litre.

B. — RÉACTIF PHOSPHOTUNGSTIQUE-PHOSPHOMOLYBDIQUE :

Dans une fiole de 1 litre introduire :

35 grammes d'acide molybdique ;

5 grammes de tungstate de sodium ;

Ajouter : 200^{cc} de lessive de soude à 10 p. 100. (1) ;

200^{cc} d'eau.

Faire bouillir vigoureusement pendant 20 à 40 minutes pour chasser l'ammoniaque que contient souvent l'acide molybdique. Refroidir, diluer à environ 350^{cc} et ajouter 125^{cc} d'acide phosphorique à 85 p. 100, compléter à 500^{cc}.

Pour l'usage, prendre 1 volume (100^{cc}) de ce réactif, 1/2 volume (50^{cc}) d'eau et 1/2 volume (50^{cc}) d'HCl concentré. Cette formule de réactif est la dernière qu'à indiqué Folin ; elle a, sur la première, l'avantage de réagir en solution acide sur l'oxyde cuivreux, tout en ne donnant pas de réaction avec les phénols. Le mode opératoire se trouve simplifié et les résultats plus exacts (2).

D'autre part, il faut nécessairement une solution étalon de glucose. Pour cela, on fait une solution de glucose chimiquement pur et anhydre à raison de 1 gramme pour 1.000^{cc} d'eau distillée : on la conserve en ajoutant 5 à 6 gouttes de xylol ou de toluène. Au moment du besoin, cette solution est diluée à volonté en vue de constituer les étalons que l'on désire.

Dans sa technique primitive, Folin indiquait de préparer un seul étalon correspondant, tout calcul fait, à un sang contenant 1 gramme de glucose par litre. Dans la suite, il a indiqué d'établir deux étalons de comparaison correspondant respectivement à 1 gramme et 2 grammes de glucose par litre. Cette précaution répond à une nécessité que nous avons déjà entrevue et même elle nous paraît insuffisante. En effet, les déterminations colorimétriques avec le colorimètre de Dubosc ou tout autre appareil similaire, ne donnent, malgré leur apparence de rigueur mathématique, que des résultats fort approchés : comme l'a si judicieusement fait observer M. François, dès que le liquide à comparer à un étalon déterminé est sensiblement différent comme intensité de teinte d'avec l'étalon lui-même, le résultat obtenu n'est plus que très approximatif. Aussi, pour avoir quelque exactitude dans les résultats, faut-il multiplier les étalons et ne choisir parmi eux, comme terme de comparaison, que celui qui se rapproche le plus du liquide à doser.

(1) 10 grs. de Na O H pour cent.

(2) Nous verrons plus loin qu'une autre raison intervient pour les rendre plus exacts.

C'est pourquoi nous avons perfectionné la méthode en préparant des étalons assez nombreux et en instituant une méthode de dosage colorimétrique en quelque sorte en deux étapes : la première, consistant à comparer les liquides sous épaisseur constante ; la seconde, en les comparant sous épaisseur variable. Ce qui va suivre illustrera notre pensée. La préparation des étalons variera suivant qu'on a désalbuminé le sang avec l'acide picrique ou avec les autres réactifs. Voyons d'abord ce dernier cas :

Préparation des étalons sucrés dans le cas où le sang a été désalbuminé par les acides tungstique, métaphosphorique, trichloracétique. — Diluer la solution de glucose à 1 gr. p. 1.000 au 1/5 (en prendre 5^{cc} que l'on additionne de 20^{cc} d'eau distillée) on a ainsi une solution de glucose à 0 gr. 20 par litre. C'est cette solution qui sert, en définitive, à préparer les étalons suivants.

On prend 5 tubes à essais de même calibre et on y verse :

	SOLUTION GLUCOSÉE à 0 gr. 20	EAU DISTILLÉE
1 ^{er} tube	2 cm ³	
2 ^e tube	1 cm ³ 5	0 cm ³ 5
3 ^e tube	1 cm ³	1 cm ³
4 ^e tube	0 cm ³ 5	1 cm ³ 5
5 ^e tube	0 cm ³ 25	1 cm ³ 75

Les mesures sont faites avec des pipettes bien sèches, très étroites, dans le genre des pipettes de Levaditi.

Si on considère que l'on traitera 2^{cc} de sang désalbuminé au 1/10 de la même façon que ces étalons de 2 centimètres cubes, on peut considérer que, tout calcul fait, l'étalon

N° 1 correspond à un sang à 2 gr. p. 1.000 de glucose.

N° 2 — — — 1 gr. 50 — —

N° 3 — — — 1 gr. — —

N° 4 — — — 0 gr. 50 — —

N° 5 — — — 0 gr. 25 — —

Maintenant que nous avons vu la préparation des solutions sucrées étalons, nous n'y reviendrons pas ; nous allons décrire comment il conviendra d'opérer pour le dosage, suivant le réactif déféquant employé.

DOSAGE DU GLUCOSE APRÈS DESALBUMINATION A L'ACIDE TUNGSTIQUE

- 1° Préparer 5 étalons de 2^{cc} comme il est dit plus haut ;
 - 2° Dans un sixième tube à essais, semblable aux premiers, mesurer 2^{cc} de sang déféqué (1) ;
 - 3° Ajouter dans chaque tube 2^{cc} de liqueur cuivrique ;
 - 4° Plonger *en même temps* ces 6 tubes dans un bain-marie bouillant, laisser 6 minutes à l'ébullition franche ;
 - 5° Retirer les 6 tubes du bain-marie tous en même temps ;
 - 6° Les plonger dans un bain d'eau froide et laisser refroidir ;
- Toutes ces opérations doivent être faites en évitant le plus possible d'agiter les tubes ;
- 7° Ajouter *rapidement* (2) dans chaque tube, 2^{cc} du réactif phospho-tungsto-molybdique dilué *prêt à l'emploi* et agiter.

Reste à faire le dosage colorimétrique.

C'est ici qu'on se rend compte de l'utilité des étalons multiples dont nous avons conseillé l'emploi. Déjà, après réduction du réactif cuivrique et formation d'oxyde cuivreux généralement hydraté, jaune et en suspension quasi-colloïdale, l'œil établit fort bien une gamme de différence entre les divers étalons et permet de voir celui qui se rapproche le plus du sang traité dans les mêmes conditions. Cette comparaison est encore plus facile et plus nette après qu'on a ajouté le réactif de Folin et que tous ces liquides ont pris leur coloration bleue définitive.

Il est de suite possible d'identifier le tube de sang avec un étalon déterminé, soit de le classer entre deux des étalons. Autrement dit, on a une première approximation qui permet de voir si le sang contient une dose de glucose comprise entre 0 gr. 50 et 1 gramme ou entre 1 gramme et 1 gr. 50, etc. Sans compter qu'en prenant une plus grande quantité d'étalons on pourrait encore avoir une première approximation plus rigoureuse. Quoiqu'il en soit, on choisit l'étalon dont la teinte se rapproche le plus de la teinte du tube correspondant au sang et il ne reste plus qu'à faire un examen colorimétrique soit avec le

(1) Si le sang paraît contenir, après un premier essai, plus de 2 grammes de glucose par litre, il sera bon de recommencer l'opération après avoir dilué le filtrat sanguin à 1/2, 1/3, suivant le cas.

(2) Voir plus loin le dispositif de DERRIEN, pour atteindre ce but.

colorimètre de Dubosc, soit avec tout autre appareil analogue tel que le colorimètre « Simplex » de Blarez ou tout autre colorimètre que l'on peut imaginer et construire soi-même.

Mais, auparavant, nous pensons qu'il y a lieu de diluer convenablement les liquides pour opérer l'examen colorimétrique, au lieu de les amener au volume uniforme de 25^{cc} comme le veut Folin.

Pour les doses voisines de 0 gr. 25 il faudra amener le volume du liquide à 10^{cc} avec de l'eau distillée, de 0 gr. 50 à 1 gramme amener le volume du liquide à 50^{cc} et au-dessus de 1 gramme étendre à 100^{cc}. Il est bien entendu que l'étalon de comparaison sera dilué au même volume.

Soit n le nombre de divisions occupées par l'étalon correspondant à e de glucose par litre.

n' le nombre de divisions occupées par le liquide correspondant au sang.

On a : $\frac{e \times n}{n'} = x$ de glucose par litre dans le sang.

Comme nous l'avons dit, Folin et Wu avaient utilisé au début une technique un peu différente ainsi qu'un réactif phosphotungsto-molybdique de composition différente et dont voici la formule :

SOLUTION D'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE-PHOSPHOMOLYBDIQUE

Dans un ballon, introduire 25 gr. d'anhydride molybdique (MoO_3) ou 34 grammes de molybdate d'ammonium [$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$] ; ajouter 140^{cc} de soude à 10 p. 100 et environ 150^{cc} d'eau. Faire bouillir vingt minutes pour chasser l'ammoniaque que contient souvent l'acide molybdique ou l'ammoniaque du molybdate. Ajouter à la solution : 100 gr. de tungstate de sodium, 50^{cc} de H^3PO_4 à 85 p. 100 et 10^{cc} d'acide chlorydrique concentré. Etendre à 700-800^{cc} ; poser sur le col du ballon un entonnoir et un verre de montre et porter à une douce ébullition, pendant au moins quatre heures, en versant de temps en temps de l'eau chaude pour remplacer celle qui est vaporisée. Laisser refroidir, compléter à un litre.

Pour l'usage, prendre 1 volume (100^{cc}) de ce réactif, 1/2 volume (50^{cc}) d'eau et 1/2 volume (50^{cc}) d'acide chlorydrique concentré. Il y avait lieu également de préparer une solution saturée de carbonate de soude.

La technique du dosage était la suivante :

Dans deux tubes à essais, gradués à 25^{cc}, introduire dans l'un 2^{cc} de filtrat sanguin et dans l'autre 2^{cc} de solution titrée de sucre. Dans chaque tube, ajouter 2^{cc} de solution alcaline de cuivre et maintenir les tubes au bain-marie *bouillant* pendant six minutes. Les retirer et ajouter sans refroidir, au moyen d'une pipette, 1^{cc} du réactif phosphotungstique-phosphomolybdique. Faire cette addition dans l'étalon et dans le sang examiné presque au même instant : un même étalon ne pourra guère servir à la comparaison de plus de quatre échantillons. Mélanger, refroidir et ajouter 5^{cc} de solution saturée de carbonate de soude. Compléter à 25^{cc} dans chaque tube, laisser au repos cinq minutes, comparer au colorimètre. La coloration bleue intense qui se développe peu à peu reste inaltérée plusieurs jours.

Pour nous assurer de l'exactitude de cette méthode, nous avons dosé, suivant la technique primitive et avec le réactif à employer avec elle, des solutions titrées de glucose dont nous ignorions le titre, solutions traitées par le tungstate de soude comme s'il s'agissait de sang. Voici quels furent les résultats :

SOLUTION DE GLUCOSE à	GLUCOSE TROUVÉ
0 gr. 02 par litre	0 gr. 024 par litre
0 gr. 05 d°	0 gr. 054 d°
0 gr. 10 d°	0 gr. 112 d°
0 gr. 20 d°	0 gr. 235 d°

Les chiffres trouvés sont un peu supérieurs à ceux du glucose contenu dans les solutions. Cela tient ⁽¹⁾ à ce que la coloration bleue provenant de l'action du carbonate de soude sur l'oxyde cuivrique non réduit contenu dans le liquide à examiner, s'ajoute à la coloration bleue donnée par le réactif phospho-tungsto-molybdique avec l'oxyde cuivreux ; c'est là une cause d'erreur que ne paraissent pas avoir entrevue les auteurs de la méthode.

Nous avons effectué des dosages de solutions titrées de glucose avec les deux réactifs de Folin et Wu, ces solutions

(1) Sans compter que, lorsqu'on opère sur du sang, le réactif est aussi coloré par les phénols, comme on l'a vu plus haut.

ayant été traitées par l'acide tungstique comme s'il s'agissait de sang. Nous donnons ci-dessous les résultats :

SOLUTION DE GLUCOSE à	GLUCOSE TROUVÉ	
	Réactif de Folin n° 1	Réactif de Folin n° 2
0 gr. 50 par litre	0 gr. 59 par litre	0 gr. 52 par litre
0 gr. 75 d°	0 gr. 81 d°	0 gr. 73 d°
1 gr. d°	1 gr. 24 d°	0 gr. 986 d°

Les mêmes solutions traitées par l'acide métaphosphorique, comme il sera dit plus loin, ont fourni les résultats suivants :

SOLUTION DE GLUCOSE à	GLUCOSE TROUVÉ	
	Réactif de Folin n° 1	Réactif de Folin n° 2
0 gr. 50 par litre	0 gr. 56 par litre	0 gr. 50 par litre
0 gr. 75 d°	0 gr. 789 d°	0 gr. 74 d°
1 gr. d°	1 gr. 12 d°	1 gr. 03 d°

Voici également les chiffres obtenus dans les mêmes conditions avec un sang et un sérum :

	SANG DÉSALBUMINÉ		SÉRUM DÉSALBUMINÉ	
	Acide tungstique	Acide Métaphosphorique neutralise	Acide Tungstique	Acide Métaphosphorique neutralise
Réactif de Folin n° 1	0 gr. 78	0 gr. 75	0 gr. 83	0 gr. 87
Réactif de Folin n° 2	0 gr. 62	0 gr. 66	0 gr. 75	0 gr. 85

Comme on le voit, les résultats obtenus avec le réactif préparé suivant la dernière formule de Folin et Wu, sont plus précis que ceux obtenus avec la première, ce qui justifie la modification apportée par l'auteur à son procédé primitif.

DOSAGE DU GLUCOSE APRÈS DÉSALBUMINATION A L'ACIDE MÉTAPHOSPHORIQUE

A titre de vérification, nous avons traité, d'abord comme il a été dit pour la désalbumination du sang, des solutions

titrées de glucose dont nous ignorions le titre. L'expérience nous a montré qu'on obtenait des chiffres trop faibles avec le réactif primitif de Folin et aucune réduction avec la dernière formule ; les tableaux suivants en font foi :

SOLUTION DE GLUCOSE à	GLUCOSE TROUVÉ		
	SOLUTION DE GLUCOSE TRAITÉE PAR		
	Eau distillée	Acide Tungstique	Acide Métaphosphorique
0 gr. 20 par litre	0 gr. 19	0 gr. 22	0 gr. 15
1 gr. d°	1 gr. 1	1 gr. 15	0 gr. 87
2 gr. d°	2 gr. 1	2 gr. 1	1 gr. 73

GLUCOSE RÉEL	GLUCOSE TROUVÉ		
	AVEC NEUTRALISATION	SANS NEUTRALISATION	
		Réactif de Folin 1 ^{re} Formule	Réactif de Folin 2 ^e Formule
0 gr. 25 par litre	0 gr. 28	0 gr. 19	Pas de-réduction
0 gr. 50 d°	0 gr. 53	0 gr. 41	d°
1 gr. d°	1 gr. 03	0 gr. 85	d°
1 gr. 50 d°	1 gr. 56	1 gr. 28	d°
2 gr. d°	2 gr. 06	1 gr. 70	d°

Nous avons été amené à examiner si l'acidité du liquide n'avait pas d'influence sur la formation de l'oxyde cuivrique. En effet, le liquide traité par l'acide tungstique est pratiquement neutre ; le liquide traité par l'acide métaphosphorique, au contraire, est nettement acide.

Pour neutraliser cette acidité trop forte, nous avons essayé la lessive de soude, mais les résultats n'ont pas été améliorés sensiblement.

En effet, dans trois tubes à essai nous avons placé 2^{cc} d'une solution de glucose à 1 gr. p. 100 et respectivement 2, 4, 6 gouttes de lessive de soude avant d'ajouter la liqueur cuivrique. Nous avons retrouvé les quantités suivantes de glucose au dosage : 0 gr. 60 p. 1.000, 0 gr. 80 p. 1.000, 0 gr. 68 p. 1.000.

Nous avons également essayé le carbonate de chaux ; mais nous n'avons pu l'employer, car nous n'obtenions pas un liquide absolument clair, à la filtration, ce qui est indispensable pour opérer la comparaison avec le tube étalon.

Nous nous sommes servi, en dernier lieu, de carbonate de soude, en solution saturée. En procédant ainsi, on n'introduit pas dans le liquide de dosage d'éléments étrangers, puisque le réactif cuivrique en contient déjà. D'après les essais effectués, nous avons remarqué que la quantité optima de carbonate de soude à ajouter aux 2^{cc} de liquide sanguin traité par l'acide métaphosphorique était de cinq gouttes de solution saturée de carbonate de soude.

TITRE DE LA SOLUTION DE GLUCOSE	GLUCOSE TROUVÉ				
	Solution de Glucose et Eau distillée	Solution de Glucose et Eau et une goutte de Carbonate de soude	Solution de Glucose et Eau et 5 gouttes de Carbonate de soude	Solution de Glucose et Acide Métaphosphorique	Solution de Glucose et Acide Métaphosphorique et 5 gouttes de Carbonate de soude
0 gr. 25 p. 1000	0 gr. 26	0 gr. 24	0 gr. 24	0 gr. 21	0 gr. 27
0 gr. 50 d°	0 gr. 492	0 gr. 5	0 gr. 51	0 gr. 44	0 gr. 51
1 gr. d°	1 gr.	1 gr. 02	1 gr. 02	0 gr. 87	1 gr. 09

C'est pourquoi tout en observant exactement la même technique que pour le dosage après désalbumination à l'acide tungstique, on aura soin, avant l'addition de la liqueur cuivrique, d'ajouter aux 2^{cc} de filtrat sanguin sur lesquels on opère, cinq gouttes de solution saturée de carbonate de soude.

Comme on peut s'en rendre compte dans le tableau suivant, qui indique les résultats obtenus en effectuant le dosage dans le sang de diverses espèces animales après désalbumination par les acides tungstique et métaphosphorique, on peut indifféremment employer l'un de ces réactifs, les chiffres sont pratiquement superposables.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ à	
	Acide Métaphosphorique et Neutralisation	Acide Tungstique
Humain	1 gr. 36	1 gr. 39
Porc	1 gr. 20	1 gr. 12
d° (24 heures après)	1 gr.	0 gr. 96
Bœuf	0 gr. 86	0 gr. 84
d° (24 heures après)	0 gr. 70	0 gr. 69
Humain	1 gr. 32	1 gr. 23
d° (24 heures après)	0 gr. 65	0 gr. 60
Mouton	0 gr. 83	0 gr. 76
d° (24 heures après)	0 gr. 56	0 gr. 64
Humain	0 gr. 54	0 gr. 62
Porc	0 gr. 95	0 gr. 84
d° (24 heures après)	0 gr. 68	0 gr. 65
Mouton	1 gr. 03	0 gr. 90
d° (24 heures après)	0 gr. 63	0 gr. 57

DOSAGE DU GLUCOSE APRÈS DÉSALBUMINATION DU SANG A L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE

La technique employée a été la même qu'avec l'acide tungstique. Comme avec l'acide métaphosphorique, les résultats obtenus sont bien inférieurs au titre réel, ainsi qu'on le verra pour les solutions de glucose dans lesquelles nous avons effectué nos dosages.

SOLUTION DE GLUCOSE à	GLUCOSE TROUVÉ
0 gr. 20 par litre	0 gr. 11 par litre
1 gr. d°	0 gr. 60 d°
2 gr. d°	1 gr. 60 d°

L'addition de soude, de carbonate de chaux, de carbonate de soude, en quelque quantité que ce soit, n'a pas amélioré les résultats. Ils sont restés très inférieurs à ceux qu'on a obtenus après défécation tungstique et même après défécation métaphosphorique *sans neutralisation* consécutive.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ à		
	Acide Métaphosphorique non neutralisé	Acide Tungstique	Acide Trichloracétique
Humain.	0 gr. 39	0 gr. 46	0 gr. 17
Humain.	0 gr. 18	0 gr. 27	0 gr. 15
Porc.	0 gr. 55	0 gr. 73	0 gr. 17
Humain.	0 gr. 28	0 gr. 46	0 gr. 17

Ce mode de désalbumination doit donc être abandonné.

PEUT-ON EMPLOYER LA LIQUEUR ORDINAIRE DE FEHLING COMME RÉACTIF ?

Nous avons aussi essayé de remplacer la liqueur cuivrique indiquée par Folin et Wu par la liqueur de Fehling, d'usage courant, en la diluant au $\frac{1}{4}$, ce qui donne une teneur en cuivre très voisine de celle indiquée par les auteurs. Nous avons dû renoncer à l'employer, la gamme des étalons étant defectueuse. En effet, les tubes témoins correspondant à 2 gr., 1 gr. 50, 1 gr. de glucose par litre donnent de bons résultats, mais les tubes à 0 gr. 50, 0 gr. 25 sont troubles et se prêtent mal à la lecture colorimétrique.

DOSAGE DU GLUCOSE DANS LE SANG DÉSALBUMINÉ PAR L'ACIDE PICRIQUE

Derrien et Fontès ont utilisé la méthode de Folin pour effectuer le dosage du glucose dans un sang désalbuminé par l'acide picrique. Le sang est déféqué comme il a été dit pour les chlorures (p. 22) et le reste du dosage se fait comme si le sang avait été désalbuminé par l'acide tungstique et en utilisant la dernière formule de réactif tungsto-molybdique. Toutefois, l'examen colorimétrique exige des précautions spéciales. En effet, en fin d'opération, l'étalon glucosé est bleu, le liquide sang picriqué est vert ; on ne peut donc les comparer en lumière blanche, ces deux teintes n'étant pas identiques. Les auteurs recommandent alors de faire les lectures au colorimètre dans la

chambre obscure en *lumière picrique* ⁽¹⁾. L'obtention de cette lumière est réalisée en enfermant une lampe électrique, dans une boîte percée d'un trou sur une de ses faces et en faisant traverser au faisceau lumineux qui sort de cette ouverture, une cuve à faces parallèles renfermant une solution d'acide picrique (épaisseur 8^{cm}). Ainsi, le témoin bleu et la solution, en analyse, verte, apparaissent toutes-deux vertes, dans les champs du colorimètre. Si on utilise le colorimètre de Duboseq, on enverra naturellement le faisceau de lumière jaune sur le miroir de l'appareil.

Cependant, en vue de simplifier les choses pour le pharmacien qui ne possède pas toujours de chambre noire et encore moins de colorimètre de Duboseq, appareil coûteux bien facile à remplacer, comme nous l'avons déjà dit, nous avons légèrement modifié la technique de Derrien et Fontès, pour la rendre utilisable sans chambre obscure et avec un colorimètre composé simplement de deux tubes gradués (type Simplex).

Cette modification concerne d'abord la confection des étalons sucrés : on les prépare en effet, comme on l'a vu plus haut (p. 48) mais, en diluant la solution glucosée à 1 p. 1.000, non plus avec de l'eau, mais avec une solution d'acide picrique saturée diluée à moitié (sensiblement 5 grs p. 1.000^{cc}). Tout le reste de la technique ne varie pas. Mais en fin de compte, on obtient des liquides étalons dont la teinte est comparable au liquide sanguin, même en lumière blanche. Cependant, nous utilisons aussi la lumière jaune, par surcroît de précaution. Mais nous n'opérons pas en chambre noire, grâce au dispositif suivant :

Avec une solution d'acide picrique on remplit un flacon plat à faces parallèles éloignées l'une de l'autre de 4 à 5 centimètres. On dispose ce flacon couché à plat à 6 ou 7 centimètres au-dessus d'une feuille de papier blanc, en le faisant reposer aux deux extrémités sur deux supports d'égale hauteur, tels que blocs de bois ou boîtes en carton. Les deux tubes colorimétriques sont posés directement sur la face supérieure du flacon et on interpose entre les tubes et la source lumineuse,

(1) E. DERRIEN et FONTÈS. — Dosage colorimétrique du glucose dans de faibles quantités de sang ou de liquide céphalo-rachidien. — *Bull. Soc. chim. de France*, 4^e série (t. 27, p. 327).

qu'il s'agisse de la lumière solaire ou d'une lumière artificielle, un écran constitué par une planchette de bois ou une lame de carton s'appuyant sur le flacon. Les liquides à comparer ne sont ainsi traversés que par de la lumière jaune et pratiquement très comparables.

Pour montrer que par cette technique on obtient des résultats identiques à ceux des autres procédés déjà examinés, nous donnerons, comme exemple, les résultats obtenus :

1° Avec des solutions aqueuses et titrées qui ont été traitées par différents réactifs absolument comme s'il s'agissait d'un sang.

SOLUTION DE GLUCOSE à	GLUCOSE TROUVÉ		
	SOLUTIONS DE GLUCOSE TRAITÉES PAR		
	Acide Métaphosphorique	Acide Tungstique	Acide Picrique (Technique personnelle)
2 gr. p. 100	2 gr. 06	2 gr. 07	2 gr. 1
1 gr. 50 d°	1 gr. 55	1 gr. 47	1 gr. 50
1 gr. d°	1 gr. 03	1 gr. 04	1 gr. 05
0 gr. 50 d°	0 gr. 49	0 gr. 49	0 gr. 52
0 gr. 25 d°	0 gr. 24	0 gr. 25	0 gr. 26

2° Avec des sangs appartenant à différentes espèces animales.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ à		
	Acide Métaphosphorique	Acide Tungstique	Acide Picrique (Technique personnelle)
Mouton	0 gr. 93 par litre	0 gr. 89	0 gr. 90
Porc	0 gr. 80 d°	0 gr. 78	0 gr. 76
Veau	0 gr. 95 d°	0 gr. 93	0 gr. 91

Comme on le voit, les résultats sont pratiquement superposables, quel que soit le mode de désalbumination employé. Au point de vue pratique, on peut donc appliquer la méthode de Folin à un sang désalbuminé à l'acide métaphosphorique, tungstique ou picrique, ce qui a son importance pratique.

Enfin, il est indifférent d'opérer soit sur le sang, soit sur le

sérum, ainsi qu'on le verra dans le tableau ci-dessous. Mais, à notre avis, il est préférable d'utiliser le sang lui-même, ce qui permet de ne prélever, à la rigueur, sur le malade, qu'une très petite quantité de ce liquide.

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ à					
	Acide Métaphosphorique		Acide Tungstique		- Acide Picrique (Technique personnelle)	
	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM
Mouton	0 gr. 833	0 gr. 86	0 gr. 875	0 gr. 847	0 gr. 816	0 gr. 806
Mouton	1 gr. 1	1 gr. 07	0 gr. 90	0 gr. 96	1 gr. 1	1 gr. 03
Bœuf	0 gr. 48	0 gr. 50	0 gr. 45	0 gr. 53	0 gr. 42	0 gr. 50
Mouton	0 gr. 85	1 gr.	0 gr. 80	0 gr. 90	0 gr. 82	0 gr. 90
Bœuf	0 gr. 87	0 gr. 90	0 gr. 71	0 gr. 81	1 gr. 08	1 gr. 2
Mouton	0 gr. 52	0 gr. 55	0 gr. 48	0 gr. 49	0 gr. 57	0 gr. 60

Il va sans dire que le sang doit être examiné le plus rapidement possible après le prélèvement, car on sait qu'il est, au bout de peu de temps, le siège d'une glycolise⁽¹⁾ transformant le glucose en acide lactique, comme l'a montré Chelle⁽²⁾ et comme le confirment les analyses suivantes :

SANG	SANG DÉSALBUMINÉ à			
	Acide Métaphosphorique		Acide Tungstique	
	Au prélèvement	24 heures après	Au prélèvement	24 heures après
Porc	1 gr. 20 pr litre	1 gr. pr litre	1 gr. 12 pr litre	0 gr. 96 pr litre
Bœuf	0 gr. 86 d°	0 gr. 70 d°	0 gr. 84 d°	0 gr. 69 d°
Humain	1 gr. 32 d°	0 gr. 65 d°	1 gr. 23 d°	0 gr. 60 d°
Mouton	0 gr. 83 d°	0 gr. 56 d°	0 gr. 76 d°	0 gr. 64 d°
Porc	0 gr. 95 d°	0 gr. 68 d°	0 gr. 84 d°	0 gr. 65 d°
Mouton	1 gr. 03 d°	0 gr. 63 d°	0 gr. 90 d°	0 gr. 57 d°

Si, par suite de diverses circonstances, on est obligé de n'opérer que plus tard, il faudra faire un dosage d'acide lactique pour

(1) CLAUDE BERNARD. — Compte-rendu de la Soc. de Biologie (1849).

(2) CHELLE. — Dosage clinique des hydrates de carbone et de l'acide lactique du sang et des autres liquides de l'organisme. — *Bull. des travaux de la Société de Phie de Bordeaux* (Mai 1914).

traduire en glucose l'acide lactique qui aura pris naissance. On emploiera dans ce but la méthode de Chelle⁽¹⁾.

La critique la plus sérieuse que l'on puisse faire à cette méthode, comme à toutes celles qui dosent le glucose par formation d'oxyde de cuivre, est la possibilité de réoxydation de l'oxyde cuivreux. De nombreux auteurs ont cherché à éviter cette cause d'erreur par différents artifices de technique ou un matériel spécial. Pour y obvier, Folin et Wu utilisent des tubes de forme spéciale, présentant un étranglement à une hauteur du fond telle que le niveau du liquide atteigne cette partie rétrécie, se trouvant ainsi en contact avec l'air par une surface aussi réduite que possible.

Dans la pratique, le dosage s'effectuant rapidement et la réoxydation se produisant en même temps dans le tube contenant le filtrat sanguin et le tube étalon, on peut très bien, sans crainte d'avoir de fortes erreurs, employer des tubes à essais ordinaires.

Il y a un grand intérêt à ce que tous les tubes soient chauffés à la même température pendant le même temps, mais il est essentiel que les liquides soient à la même température quand on y ajoute le réactif, le maximum de coloration se développant plus rapidement dans les solutions chaudes. Dans ce but, il est bon de porter les tubes dans un bain d'eau froide, après le chauffage, surtout lorsqu'on effectue des dosages en série.

Il est également nécessaire, comme le recommandent Folin et Wu, de verser, aussi simultanément que possible, le réactif, dans les témoins et dans les liquides à examiner. On peut y arriver assez facilement avec un peu d'habitude et de dextérité manuelle. Cependant, on opérera encore plus rapidement, en utilisant le dispositif et la technique imaginés par Derrien et Fontès⁽²⁾.

« Des fonds de tubes à essais, hauts de 1 centimètre environ sont munis, à la flamme, d'un petit bec et collés par de la cire de Golaz, sur une petite règle de bois. On les espacera convenablement, pour que leurs intervalles correspondent à celui qui sépare les tubes à réaction dans leur porte-tubes.

(1) Tout ce qui vient d'être dit pour le sang est applicable au dosage du glucose dans le liquide céphalo-rachidien.

(2) Loc., citat.

» On mesurera à l'avance 1^{cc} du réactif dans chacun d'eux. Au moment voulu, un simple coup de bascule, appuyé à la règle, fait tomber le réactif dans chaque tube.

» On peut employer ce procédé pour un nombre quelconque de tubes ».

III. — Méthode de Goiffon et Nepveux ⁽¹⁾

Le principe de cette méthode est le suivant : On fait agir, à chaud, sur la liqueur de Fehling, le liquide obtenu en désalbuminant le sang par le réactif de Bang. L'oxyde cuivreux formé est recueilli, lavé, dissous dans le minimum nécessaire d'acide chlorhydrique pur : le tout est additionné d'eau pour obtenir un volume déterminé. La solution cuivrique, ainsi préparée, est traitée ensuite par une solution de ferrocyanure de potassium et une solution aqueuse saturée d'acide tartrique, de façon à déterminer la formation de ferrocyanure de cuivre colloïdal stable et homogène. On compare la coloration rougeâtre obtenue à celle d'étalons répondant à un titre connu de cuivre et traités de la même façon.

Les résultats les plus précis seraient obtenus avec une prise d'essai contenant de 0^{mg} 20 à 1^{mg} 5 de glucose ; pour les concentrations supérieures, il faudrait diluer le liquide sucré ; pour les liqueurs moins riches, il faudrait les concentrer. D'après les auteurs, en employant 10^{cc} comme volume total, on peut doser 0^{mg} 10 de glucose.

Pour effectuer le dosage du glucose on procède aux opérations suivantes :

A. — DÉSALBUMINATION DU SANG :

Pour la désalbumination on emploie le réactif de Bang :

Solution aqueuse saturée de chlorure de potassium	130 ^{cc}
Acide chlorhydrique à 25 p. 100.....	0 ^{cc} 15
Eau distillée	64 ^{cc}

Dans une capsule de porcelaine, mettre 1^{cc} de sang ou de sérum, ajouter 15^{cc} de réactif de Bang. Agiter vivement pendant

¹⁾ GOIFFON et NEPVEUX. — Méthode microchimique de dosage des sucres dans les liquides de l'organisme. (*C. R. de la Société de Biologie* (t. 83, p. 121, 1920).

1 minute, porter à l'ébullition et filtrer ; le précipité est lavé avec le réactif de Bang et tous les liquides de filtration sont réunis.

B. — RÉDUCTION ET DOSAGE.

1^o RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Liqueur de Fehling.

b) Solution étalon de sulfate de cuivre ($\text{So}^4\text{Cu} + 5 \text{H}^2\text{o}$) à 3 gr. 50 p. 1.000 titrée exactement en sucre réducteur. (1^{cc} de cette solution correspond à 0^{mg} 5 de glucose).

c) Solution aqueuse saturée d'acide tartrique.

d) Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium à 5 p. 100.

2^o TECHNIQUE.

a) Préparation des étalons.

Dans leur technique, Goiffon et Nepveux indiquent de faire un seul étalon. Pour les raisons indiquées dans la préparation des étalons de glucose dans la méthode de Folin et Wu, nous avons préparé une échelle colorimétrique, ainsi qu'il suit pour faciliter la comparaison.

Prendre 5 ballons jaugés de 50^{cc}, introduire respectivement dans chacun d'eux :

2^{cc}, 1^{cc} 5, 1^{cc}, 0^{cc} 5, 0^{cc} 25 de solution de sulfate de cuivre à 3 gr. 50 p. 1000 et 3^{cc} d'eau distillée, agiter.

Tout calcul fait :

l'étalon à 2^{cc} correspond à un sang à 1 gr. p. 1000 de glucose.

—	1 ^{cc} 50	—	—	0 gr. 75	—
—	1 ^{cc}	—	—	0 gr. 50	—
—	0 ^{cc} 50	—	—	0 gr. 25	—
—	0 ^{cc} 25	—	—	0 gr. 125	—

DOSAGE DU GLUCOSE.

Le liquide sanguin, désalbuminé comme il a été dit plus haut, est mis dans un petit ballon à fond rond, avec 1^{cc} de liqueur de Fehling, on porte à l'ébullition pendant 3 minutes. Le liquide contenant l'oxyde de cuivre est filtré sur de la bourre d'amiant et le précipité est lavé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée bouillante jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de coloration rouge avec le ferrocyanure de potassium.

Pour rendre plus facile cette opération et pour éviter le plus possible le contact de l'air, nous nous sommes servi d'un dispositif indiqué par Pregl et décrit par L. de Saint-Rat et

Ronfaut ⁽¹⁾. L'appareil se compose d'un tube à entonnoir de 1^{cm} de diamètre, muni dans sa partie inférieure d'un tampon de bourre d'amiante. Il est fermé, à sa partie supérieure, par un bouchon de caoutchouc que traverse un tube de faible diamètre, deux fois recourbé à angle droit. Le tube à entonnoir est placé sur une fiole conique à vide. Le tube de faible diamètre plonge dans le ballon où l'on a effectué la réduction. Une légère aspiration le fait passer sur l'amiante qui retient l'oxydure ; on lave à plusieurs reprises avec de l'eau distillée bouillante, par aspiration, jusqu'à ce que cette eau ne donne plus de coloration avec le ferrocyanure de potassium et l'acide tartrique. On rince la fiole conique et on dissout l'oxyde avec le minimum d'acide chlorhydrique possible, 2 à 3 gouttes diluées dans 5^{cc} d'eau distillée. Le liquide contenant l'oxyde de cuivre en solution est amené à 40^{cc} dans le ballon jaugé de 50^{cc}.

A chacun des cinq ballons de l'échelle colorimétrique et à celui contenant l'oxyde de cuivre dissous, ajouter trois gouttes de solution saturée aqueuse d'acide tartrique et aussi rapidement que possible cinq gouttes de solution de ferrocyanure de potassium, compléter à 50^{cc} avec de l'eau distillée. Il ne reste plus qu'à comparer au colorimètre, le liquide sanguin avec le liquide dont la teinte se rapproche le plus.

Soit n le nombre de divisions occupées par l'étalon correspondant à e de glucose par litre.

Soit n' le nombre de divisions occupées par le liquide correspondant au sang.

On a $\frac{e \times n}{n'} = x$ de glucose par litre dans le sang.

Les étalons obtenus par cette méthode sont limpides, d'une belle couleur grenat foncé ; au contraire, les liquides obtenus avec la solution d'oxyde cuivrique provenant du sang présentent une coloration plus brune, trouble souvent, d'aspect différent des étalons. De là une grande difficulté pour effectuer la comparaison au colorimètre, comparaison quelquefois presque impossible, mais toujours incertaine.

Nous avons également essayé, pour la désalbumination,

⁽¹⁾ L. DE SAINT-RAT et J. RONFAUT. — Sur le dosage de petites quantités de sucres réducteurs dans les liquides de l'organisme. — *Bulletin des Sciences pharmacologiques* (Juin 1920, n° 6).

Cet appareil n'est, d'ailleurs, qu'une réduction de celui de BERTRAND.

d'utiliser les procédés au métaphosphate de soude à 0 gr. 60 p. 100 et au tungstate de soude à 10 p. 100 décrits plus haut, pensant remédier à la différence de coloration signalée ci-dessus. Avec les liquides traités par le tungstate de soude, nous n'avons obtenu aucune réduction; avec le métaphosphate, la réduction se produisait, mais incomplètement, car nous trouvions, après dosage, des quantités de glucose bien inférieures à celles obtenues par la méthode de Folin et Wu. La teinte du liquide à examiner était également brunâtre, moins rouge que le liquide des étalons, le dosage était difficile, sinon impossible, et les résultats incertains, ainsi qu'on s'en rendra compte par le tableau suivant :

SANG	MÉTHODE FOLIN	MÉTHODE GOIFFON	MÉTHODE GOIFFON
	Sang désalbuminé à l'Acide Métaphosphorique	Sang désalbuminé à Réactif de Bang	Sang désalbuminé à l'Acide Métaphosphorique
Mouton	0 gr. 96	0 gr. 65	0 gr. 42
Mouton	0 gr. 73	0 gr. 39	0 gr. 27
Humain	0 gr. 68	0 gr. 66	0 gr. 74
Humain	0 gr. 70	0 gr. 10	0 gr. 15

Cette méthode manque donc de précision. Cela doit être attribué à deux causes, d'abord à la différence de coloration et d'aspect entre le liquide à titrer et les étalons, ensuite à la reoxydation ⁽¹⁾ de l'oxyde cuivreux très difficile à éviter, même avec un dispositif approprié. Pour ces raisons, elle ne nous semble pas devoir être prise en considération.

IV. — Méthode de Chelle ⁽²⁾

Cette méthode est basée sur la propriété que possèdent les hydrates de carbone traités par l'acide sulfurique de donner des composés furfuroliques qui peuvent se conjuguer en milieu

(1) Pendant l'ébullition, la filtration et les lavages, cette réoxydation peut atteindre 30 à 40 p. 100 d'après Bang.

(2) CHELLE. — Dosage clinique des hydrates de carbone et de l'acide lactique du sang et des autres liquides de l'organisme. — *Bull. des Trav. de la Soc. de Pharmacie de Bordeaux* (Mai 1914).

sulfurique avec certains phénols et notamment le thymol pour donner des produits colorés. Nous allons décrire la technique de l'auteur.

DÉSALBUMINATION DU SANG

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution de métaphosphate de soude à 0 gr. 60 p. 100.

b) Solution d'acide sulfurique diluée au vingtième. Pour la préparation de cette solution, il faut employer de l'acide sulfurique ($D = 1.84$) pur, absolument *exempt d'acides nitreux ou nitrique dont la présence même à l'état de traces empêche la réaction colorée ultérieure.*

B. — TECHNIQUE :

« Dans un tube à essais, mettre 8^{cc} de solution de métaphosphate de soude à 0 gr. 60 p. 100, ajouter 1^{cc} de sang avec une pipette très effilée à écoulement direct, de façon à pouvoir la rincer avec les 8^{cc} de liquide déjà introduits dans le tube, cela à cause de la viscosité du sang, puis 1^{cc} d'acide sulfurique au vingtième, agiter et filtrer au bout de quinze minutes ou centrifuger. »

DOSAGE DU GLUCOSE

A. RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution de chlorure de sodium à 1 gramme par litre.

b) Solution alcoolique de thymol à 1 p. 20. Dissoudre 1 gramme de thymol dans 20^{cc} d'alcool à 90-95°.

c) Solution titrée de glucose à 1 gramme par litre.

d) d° d° d° à 0 gr. 20 d° préparée au moment de l'emploi en étendant au cinquième la solution à 1 gramme par litre.

B. — TECHNIQUE :

Nous emploierons les termes mêmes de l'auteur :

« Mettre dans six tubes à essai, 0^{cc} 5 d'une solution renfermant 1 gramme par litre de chlorure de sodium et 0^{cc} 5 d'une solution renfermant par litre 0 gr. 01, 0 gr. 02, 0 gr. 04, 0 gr. 06,

» 0 gr. 08, 0 gr. 10 de glucose par litre ⁽¹⁾. Dans un septième tube,
 » mettre 0^{cc} 5 du filtrat sanguin et 0^{cc} 5 d'eau distillée. Ce tube que
 » nous désignerons par la marque S/20 correspond au sang dilué
 » au vingtième. Dans un huitième tube S/40, mettre 0^{cc} 25 de
 » filtrat sanguin, 0^{cc} 25 de chlorure de sodium à 1 p. 100 et 0^{cc} 5
 » d'eau distillée, il correspond donc au sang dilué au quaran-
 » tième. Ajouter dans chaque tube, 5^{cc} d'acide sulfurique *pur* et
 » agiter, laisser refroidir jusqu'à ce que les liquides soient
 » tièdes, ce qui exige environ dix minutes. Verser dans chacun
 » de ces tubes 0^{cc} 2 ou 10 gouttes de la solution de thymol au
 » vingtième. Agiter et attendre sept ou huit minutes. On peut
 » alors pratiquer le dosage colorimétrique.

» Si la coloration S/20 est intermédiaire entre celles obser-
 » vées avec les étalons renfermant 0 gr. 08 et 0 gr. 10, on a :

» Glucose par litre de sang : 0 gr. 09 $\times$ 20 = 1 gr. 80.

» Si la coloration de S/40 est égale au tube de 0 gr. 02, on a

» Glucose par litre de sang 0 gr. 02 $\times$ 40 = 0 gr. 80.

» Si les tubes S/20, S/40 étaient plus colorés que notre étalon
 » à 0 gr. 10, il suffirait d'étendre le contenu des tubes S/20, S/40
 » au demi, au tiers avec de l'acide sulfurique et de comparer
 » avec les étalons en se rappelant que la quantité du tube étalon
 » fournissant la même intensité de coloration que le tube exa-
 » miné, devra être multipliée dans les mêmes proportions. »

Cette méthode, contrôlée par l'auteur avec le procédé de Bierry-Portier ⁽²⁾ (méthode de G. Bertrand), s'est montrée d'une exactitude très suffisante. On n'a donc rien à lui reprocher.

Nous n'avons pas de même comparé la méthode de Folin avec celle de Bierry et Portier, car d'autres l'ont fait avant nous (notamment Guillaumin).

⁽¹⁾ On obtient très aisément ces 0^{cc} 5 au titré voulu en employant la solution de glucose à 0 gr. 20, de la façon suivante :

SOLUTION à 0 gr. 20		Eau
Etalon sucré à 0 gr. 01.....	0 cc 05.....+	0 cc 45
do à 0 gr. 02.....	0 cc 1.....+	0 cc 4
do à 0 gr. 04.....	0 cc 2.....+	0 cc 3
do à 0 gr. 06.....	0 cc 3.....+	0 cc 2
do à 0 gr. 08.....	0 cc 4.....+	0 cc 1
do à 0 gr. 10.....	0 cc 5.....+	0 cc

⁽²⁾ BIERRY et PORTIER — Méthode de dosage des hydrates de carbone dans le sang et les tissus. — *Biologie Médicale* (p. 65, année) 1918.

Mais nous l'avons comparée avec la méthode exacte de Chelle, ce qui était fournir une preuve indirecte de sa valeur.

Le tableau suivant montrera ces résultats comparatifs.

SANG	MÉTHODE CHELLE	MÉTHODE FOLIN ₂
Humain	0 gr. 65	0 gr. 70
Cheval	0 gr. 62	0 gr. 72
Mouton.	0 gr. 17	0 gr. 21
Bœuf	0 gr. 38	0 gr. 31
Humain	1 gr. 20	1 gr. 30
Veau	0 gr. 35	0 gr. 30

L'une et l'autre méthode donnent des résultats pratiquement identiques.

En résumé, cette étude de quelques méthodes, permettant le microdosage rapide du glucose dans le sang, nous conduit aux conclusions suivantes :

1° Les méthodes de Herzfeld et de Goiffon et Nepveux sont inexactes et à rejeter ;

2° Les méthodes de Chelle et de Folin et Wu sont excellentes et ne laissent en rien désirer ;

3° La méthode de Folin et Wu peut s'appliquer au sang désalbuminé par l'acide tungstique et par l'acide metaphosphorique ;

4° On peut utiliser indifféremment le sang oxalaté ou le sérum.

Enfin, il ne faut pas oublier que les dosages doivent être effectués sur des liquides aussi frais que possible, car le glucose disparaît et se transforme en une quantité équivalente d'acide lactique. Lorsque la glycolyse s'est effectuée, on fera le dosage de l'acide lactique par la méthode de Chelle (1).

(1) Cette méthode est exposée dans le mémoire déjà cité de cet auteur.

CHAPITRE IV

Dosage de l'azote non proteique

Lorsqu'on a privé le sang de toutes les matières proteiques à l'aide d'un réactif approprié, il reste dans le filtrat, entre autres choses, de petites quantités de corps azotés divers tels que l'urée, l'ammoniaque, les bases puriques, la créatine, l'acide urique, etc., que l'on réunit sous la dénomination d'**azote non proteique, azote restant ou azote non coagulable**.

Lorsque, de cet azote non proteique, on a retranché l'azote de l'urée, il reste ce qu'on appelle l'**azote résiduel**, dont la connaissance présente un notable intérêt, car, en général, ses fluctuations correspondent à l'état de gravité de certaines affections. Le démontrer serait sortir du cadre purement technique que nous nous sommes imposé ; mais, à tous ceux que la question intéresse, nous conseillons la lecture du n° 7 du *Journal Médical Français* (Juillet 1921), que J. Castaigne a consacré aux néphrites chroniques, à l'azotémie et à l'hypertension et dans lequel il a magistralement commenté les rapports présentés sur ces questions par W. Forster (New-York) ; A. Hagge (Liege) et J. Teissier (Lyon), au premier Congrès de la Société internationale d'urologie, le 5 Juillet 1921.

D'après la définition de l'azote non proteique, on voit que sa détermination consiste à effectuer sur le sang désalbuminé un dosage d'azote total. Ce dosage se fait très commodément par la méthode modifiée de Kjehldal et, comme il est possible d'opérer sur très peu de sang, on pratique ce qu'on est convenu d'appeler un **micro-Kjehldal**.

Le sang peut être désalbuminé à l'acide tungstique (Folin et Denis ⁽¹⁾) ou à l'acide trichloracétique (Grigaut) ⁽²⁾. Nous avons aussi essayé le dosage après l'avoir désalbuminé à l'acide métaphosphorique.

La destruction ou l'hydrolyse des matières azotées et la transformation de leur azote en ammoniacque s'effectuent à l'aide d'un mélange d'acides sulfurique et phosphorique ou seulement d'acide sulfurique additionnés de traces de sulfate de cuivre, ce qui constitue, en somme, une modification de la méthode initiale de Kjehldal. Le dosage se fait par nesslerisation, c'est-à-dire à l'aide de la colorimétrie, après action du réactif de Nessler, sur l'ammoniacque formée. On peut aussi libérer cette ammoniacque par un alcali et le titrer volumétriquement, mais nous avons donné la préférence à la nesslerisation, à cause de sa simplicité.

Nous allons donc décrire ces trois opérations et comparer les résultats obtenus suivant le réactif désalbuminant employé.

A. — Désalbumination

Nous serons bref à ce sujet, la technique ayant déjà été décrite pour les dosages des chlorures et du glucose. Nous dirons simplement que :

- 1° Avec l'acide tungstique, le sang est déféqué au dixième (p. 19) ;
- 2° Avec l'acide trichloracétique, au demi (p. 20) ;
- 3° Avec l'acide métaphosphorique, au dixième (p. 20).

B. — Hydrolyse (1^{re} technique de Grigaut)

1° RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

Mixture phosphosulfurique :

Acide sulfurique pur à 66° B ^e	100 cc
Acide phosphorique pur à 60° B ^e ⁽³⁾	300 cc
Solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100	25 cc

Dans le cas où il se formerait, à la longue, un dépôt de sulfate de chaux dans ce réactif, on n'utiliserait que la partie claire surnageante.

⁽¹⁾ Loc. cit.

⁽²⁾ GRIGAUT. — *C. R. Société de Biologie* (1918, n° 22, pp. 1135.

⁽³⁾ Acide officinal.

2° TECHNIQUE :

Dans un tube à essai ⁽¹⁾ de large diamètre (20 à 25^{mm}) et long de 18 à 20 centimètres, mesurer 2^{cc} de filtrat trichloracétique, représentant 1^{cc} de sang, ou bien 5^{cc} de filtrat tungstique ou métaphosphorique, représentant 0^{cc} 5 de sang. Ajouter 1^{cc} de mixture phospho-sulfurique et un fragment de tuyau de pipe. Le tube étant maintenu vertical à l'aide d'une pince et d'un support quelconque, le chauffer à sa partie inférieure à l'aide d'une flamme en veilleuse d'un bec de Bunsen ou de la flamme d'une lampe à essence, de façon à maintenir une ébullition continue et sans soubresauts. Lorsque l'eau est évaporée et qu'apparaissent des vapeurs blanches emplissant le tube, recouvrir l'orifice de ce dernier avec un verre de montre ou une petite boule de verre soufflé. Le mélange charbonne, se décolore et prend l'aspect d'un liquide très légèrement bleuté et troublé par un peu de silice. Enlever la flamme, laisser refroidir et ajouter 5 à 10^{cc} d'eau distillée. Bien conduite, cette partie de l'opération dure de 10 à 12 minutes au maximum.

C. — Dosage

RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution à 10 grammes de soude (NaOH) pour 100^{cc} exempte de carbonate et de sulfate.

b) Réactif de Nessler.

Iodure de potassium	75 gr.
Iodure mercurique.....	100 gr.
Eau distillée	Q. s. pour 1000 ^{cc}

c) Solution étalon de sulfate d'ammoniaque correspondant à 0^{mmg} 01 d'azote par centimètre cube.

Faire d'abord la solution suivante :

Sulfate d'ammoniaque pur et sec.....	4 gr. 716
Acide sulfurique N/5	Q. s. pour 1000 ^{cc}

Prélever 10^{cc} de cette solution et ajouter assez d'eau distillée pour avoir 1.000^{cc} : on a ainsi la solution étalon.

2° TECHNIQUE :

Introduire le liquide d'hydrolyse obtenu plus haut dans un

⁽¹⁾ Les tubes en verre Pyrex ou en silice conviennent très bien ; cependant, un bon tube à essai peut faire l'affaire.

matras jaugé de 100^{cc} s'il correspond à 1^{cc} de sang (filtrat trichloracétique) ou dans un matras jaugé de 50^{cc} s'il correspond à 0^{cc} 5 de sang (filtrat tungstique ou métaphosphorique ⁽¹⁾). Rincer le tube à plusieurs reprises et verser les eaux de lavage dans le matras. Ajouter 14^{cc} 5 de soude à 10 p. 100 et mélanger.

Préparer simultanément l'étalon de la façon suivante :

Dans un ballon jaugé de 100^{cc}, verser 1^{cc} de mixture phospho-sulfurique et 25^{cc} de la solution type de sulfate d'ammoniaque (0^{mmg} 25 d'azote), amener à 70-75^{cc} avec de l'eau distillée, ajouter 14^{cc} 5 de soude à 10 p. 100 et mélanger.

Dans chaque ballon, ajouter 3 ou 6^{cc} de réactif de Nessler, suivant le volume final à obtenir, compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée et mélanger.

Centrifuger ou filtrer une portion des liquides correspondant au sang pour séparer la silice et faciliter le dosage colorimétrique. Ceci fait, comparer les liquides au colorimètre :

Soit n le nombre de divisions occupées par l'étalon correspondant à 0^{mmg} 25 d'azote pour 100^{cc} et n' le nombre de divisions occupées par le liquide correspondant au sang dilué à 1 p. 100^{cc}. On a, pour la quantité d'azote contenue dans un litre de sang,

$$0^{\text{mmg}} 25 \times \frac{n}{n'} \times 1000 = 0^{\text{gr}} 250 \times \frac{n}{n'} = x^{\text{gr}} \text{ d'azote par litre.}$$

Exemple :

$n = 20$ divisions.

$n' = 15$ divisions.

On a $0^{\text{gr}} 250 \times \frac{20}{15} = 0^{\text{gr}} 333$.

Dans le cas où le sang serait ou trop riche ou trop pauvre en azote non protéique, il serait bon de préparer un étalon ou plus fort ou plus faible pour que les colorations des solutions à comparer soient assez voisines l'une de l'autre.

B'. — Hydrolyse (2^e Technique de Grigaut ⁽²⁾)

Grigaut et Thiery ont modifié la technique précédente, inspirée de celle de Folin.

(1) Dans les deux cas, le sang se trouve dilué au centième.

(2) GRIGANT. — L'azote non protéique dans le sang. — *Biologie médicale* n° 10 (Août-Septembre 1921).

La modification consiste : 1° à effectuer l'hydrolyse au moyen de l'acide sulfurique seul additionné de traces de sulfate de cuivre ; 2° A employer un réactif de Nessler, contenant assez de soude pour que la neutralisation préalable des liquides à doser soit désormais inutile ; 3° A remplacer le fragment de ponce par une perle de verre, ce qui n'introduit pas de poussières dans le liquide et permet de mieux suivre la marche de l'opération.

1° RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

Acide sulfurique à 66°	100 cc
Solution de sulfate de cuivre à 1 p. 200	100 cc

2° TECHNIQUE :

Placer dans un tube à essai de verre ordinaire ou de Pyrex 2° de filtrat chloracétique (correspondant à 1 cc de sang), 1 cc de liqueur cupro-sulfurique et une perle de verre. Effectuer l'hydrolyse exactement comme il a été dit plus haut.

C'. — Dosage

1° RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Iodure de potassium	12 gr.
Biiodure de mercure	15 gr.
Lessive de soude	180 cc
Eau distillée	Q. s. pour 1000 cc

b) Solution étalon de sulfate d'ammoniaque comme plus haut.

2° TECHNIQUE :

Laisser-refroidir et entraîner le contenu du tube au moyen d'eau distillée dans un ballon jaugé à 100 cc, de façon à avoir au plus 75 cc de liquide.

Dans un second ballon de 100 cc placer 25 cc de solution étalon de sulfate d'ammoniaque (à 0^{mg} 01 par cc) et ajouter 50 cc d'eau.

Effectuer le titrage colorimétrique comme plus haut. Cette technique, plus simple, donne exactement les mêmes résultats que les précédentes ; nous lui donnons la préférence.

En opérant, comme il vient d'être dit, sur des sangs divers désalbuminés par les trois réactifs cités à cet effet, nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau suivant :

SANG	AZOTE NON PROTÉIQUE PAR LITRE TROUVÉ APRÈS DÉSALBUMINATION A L'ACIDE		
	Trichloracétique	Tungstique	Métaphosphorique
	GRIGAUT	FOLIN	BORDE
Humain	0 gr. 21	0 gr. 18	0 gr. 30
Mouton	0 gr. 28	0 gr. 28	0 gr. 33
d° (sérum).	0 gr. 26	0 gr. 22	0 gr. 28
Mouton	0 gr. 40	0 gr. 44	0 gr. 50
d° (sérum).	0 gr. 37	0 gr. 34	0 gr. 41
Veau	0 gr. 28	0 gr. 31	0 gr. 42
d° (sérum).	0 gr. 27	0 gr. 25	0 gr. 37
Mouton	0 gr. 44	0 gr. 54	0 gr. 60
d° (sérum).	0 gr. 42	0 gr. 50	0 gr. 54
Veau	0 gr. 28	0 gr. 25	0 gr. 26
d° (sérum).	0 gr. 24	0 gr. 23	0 gr. 25
Humain	0 gr. 28	0 gr. 30	0 gr. 33
Humain	0 gr. 33	0 gr. 31	0 gr. 28
Mouton	0 gr. 24	0 gr. 20	0 gr. 33
d° (sérum).	0 gr. 20	0 gr. 19	0 gr. 27
Mouton	0 gr. 42	0 gr. 42	0 gr. 52
d° (sérum).	0 gr. 40	0 gr. 42	0 gr. 52
Humain	0 gr. 25	0 gr. 30	
Humain	0 gr. 24	0 gr. 36	
Humain	0 gr. 31	0 gr. 38	
Humain	0 gr. 27	0 gr. 24	0 gr. 30
Humain	0 gr. 38	0 gr. 40	0 gr. 35

En résumé, quel que soit le mode de désalbumination employé, le dosage de l'azote non proteique est simple, rapide, et se prête très bien à des opérations en série.

En examinant les résultats que nous avons indiqué, on voit qu'ils sont comparables. Remarquons, toutefois, que les chiffres obtenus après désalbumination à l'acide métaphosphorique sont parfois un peu élevés.

Nous nous sommes assuré qu'il ne fallait pas incriminer une impureté du métaphosphate de soude employé. Peut-être l'acide métaphosphorique n'insolubilise-t-il pas certaines substances azotées qui seraient précipitées par les autres réactifs. Peut-être s'agit-il d'écarts d'expérience si difficiles à éviter en microanalyse? En tout cas, ces écarts ne sont pas cliniquement à considérer, comme nous aurons l'occasion de le dire.

Enfin, on a vu qu'il est pratiquement indifférent d'opérer soit sur le sang, soit sur le sérum.

CHAPITRE V

Dosage de l'Urée

Azote résiduel

De tous les composés azotés dosés en bloc sous le nom d'azote non proteique, l'urée est le plus abondant et au moins jusqu'ici, un des plus importants à connaître. Le dosage de l'urée dans le sang est journellement demandé au chimiste, soit pour connaître l'état d'urémie d'un sujet, soit pour calculer la constante uréosécrétoire d'Ambard, soit enfin pour établir le taux de l'azote résiduel, c'est-à-dire l'azote qui, dans l'azote non proteique, n'est pas l'azote de l'urée.

Depuis longtemps, on savait doser l'urée dans le sang par gazométrie à l'aide de l'hypobromite de soude. Mais, on sait que ce réactif libère non seulement l'azote de l'urée, mais aussi celui de l'ammoniaque et un peu de l'azote de certains composés existant à côté de l'urée. En outre, l'hypobromite, décomposé lui-même, dégage aussi des quantités d'oxygène, à la vérité très minimes (Grimbert). Il s'ensuit que le dosage de l'urée effectué par cette méthode fournit des résultats toujours un peu forts.

Il en est de même du procédé qui consiste à hydroliser l'urée à l'aide de l'uréase et à doser l'ammoniaque ainsi formée ; à l'ammoniaque de l'urée vient s'ajouter l'ammoniaque préformée.

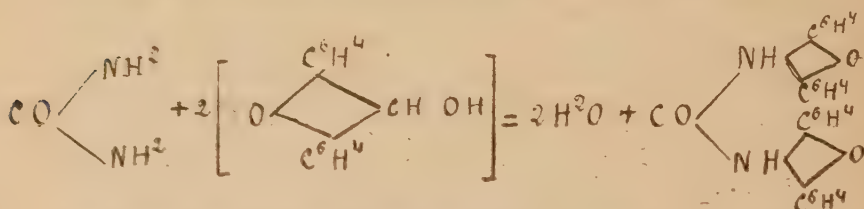
D'autre part, Fosse a eu le bonheur de trouver une méthode permettant le dosage rigoureux de l'urée seule.

Ainsi nous possédons maintenant deux classes de procédés : celui de Fosse, qui dose uniquement l'urée, et les autres, qui dosent l'urée avec une légère erreur en plus. Nous allons les exposer sans nous étendre outre mesure. En effet, pour

résumer tout ce qu'on a écrit sur ce sujet. il nous faudrait une place considérable et la question n'y gagnerait pas en clarté. Ne perdant pas de vue que nous nous sommes placé sur un terrain purement pratique, nous décrirons simplement les techniques que nous avons adoptées après avoir essayé beaucoup de celles qu'on a proposées. En les suivant, on obtiendra des résultats cliniquement très suffisants, avec le minimum de peine et aussi de matériel.

A. — Dosage de l'urée par la méthode de Fosse

Cette méthode ⁽¹⁾ utilise la propriété que possède le xanthidrol de former avec l'urée une combinaison cristalline, la dixanthylurée, pratiquement insoluble dans l'alcool méthylique.



Du poids de dixanthylurée formée, on déduit la quantité d'urée qui lui a donné naissance.

Fosse ⁽²⁾ a fait connaître le mode opératoire à suivre pour doser l'urée dans le sang. De nombreux auteurs en ont ⁽³⁾ pro-

(1) FOSSE. — *C. R.* 1907, p. 813, 1912, pp. 851-1187-1443-1820 et CLVIII, pp. 1432 et 1588.

(2) R. FOSSE, A. ROBYN et F. FRANÇOIS. — Analyse quantitative gravimétrique de l'urée. — *C. R.* CLIX, p. 367 (1914).

— R. FOSSE. — Origine et distribution de l'urée dans la nature. Application de nouvelles méthodes d'analyse de l'urée basées sur l'emploi du xanthidrol. — *Ann.-Institut. Pasteur*, xxx, p. 525 (1916).

(3) CASTAIGNE et L. CRUVEILHIER. — Le dosage pondéral de l'urée dans le sang par le procédé de Fosse. — *Journal Medical Français* VII, n° 31, p. 100 (Juillet 1918).

— FRENKEL. — Dosage de l'urée par le xanthidrol. — *Ann. de Chimie Analytique*, t. II, p. 234 (15 Août 1920).

— CARNOT, P. GÉRARD, S. MOISSONNIER. — *C. R. Soc. Biol.* LXXXII, p. 1273 (6 Décembre 1919).

— ACHARD, RIBOT, LEBLANC. *C. R. Soc. Biol.* LXXXIII, p. 291 (Mars 1920).

— LAUDAT. — *C. R. Soc. Biol.* LXXXIII, p. 730 (15 Mai 1920) et p. 1023 (10 Juillet 1920).

— MESTREZAT et JANET. — Dosage de l'urée dans le sang par le xanthidrol. Des conditions expérimentales à réaliser pour une évaluation rigoureuse. — *C. R. Soc. Biol.* LXXXIII, p. 290 (12 Juin 1920).

posé de multiples variantes en vue d'obtenir des résultats plus précis.

Nous avons adopté, à peu de choses près, la technique de Fosse, modifiée par Mestrezat et Marthe Paul-Janet (1).

DÉSALBUMINATION DU SANG

A. — RÉACTIF NÉCESSAIRE :

Nous avons employé le réactif de Fosse, qui permet de se placer dans les meilleures conditions pour la formation de la formation de la dixanthylurée.

Chlorure mercurique	2 gr. 71
Iodure de potassium	7 gr. 20
Acide acétique cristallisable.....	66 cc
Eau distillée.....	q. s. pour 100 cc

B. — TECHNIQUE :

Dans un tube à centrifuger, mélanger 10^{cc} du réactif ci-dessus et 10^{cc} de sang ou de sérum, agiter et centrifuger (2).

DOSAGE DE L'URÉE

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution récente à 1 p. 10 de xanthidrol *pur* dans l'alcool méthylique *pur*.

b) Acide acétique cristallisable.

B. — TECHNIQUE :

Dans un petit vase à saturation, mesurer 15^{cc} de liquide centrifugé, ajouter un égal volume d'acide acétique cristallisable et, en trois fois et à dix minutes d'intervalle, 3^{cc} de la solution de xanthidrol à 10 p. 100, *cette solution étant préparée au moment de l'usage*. Recouvrir d'un verre de montre ou d'une plaque de verre et attendre trois heures que l'insolubilisation de la xanthylurée soit complète.

(1) MESTREZAT et Mlle MARTHE PAUL JANET. — Sur quelques points concernant le dosage précis de l'urée dans le sérum et les humeurs par le xanthidrol. — *Journal de Pharmacie et de Chimie* n° 10 (16 Novembre 1920).

— LAUDAT. — Le dosage de l'urée dans le sang. Etat actuel de la question. *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1^{er} Janvier 1921) n° 1.

(2) On peut aussi filtrer, mais l'opération est plus longue et on obtient un peu moins de liquide clair.

Pendant ce temps, prendre un petit creuset de Gooch, en recouvrir le fond avec deux rondelles de papier filtre s'y adaptant, de façon très exacte, dessécher le tout à 100° et tarer avec les précautions d'usage.

Adapter le creuset sur une fiole conique à faire le vide que l'on relie à une trompe à eau ou à tout autre machine aspirante ⁽¹⁾. Humecter le papier avec quelques gouttes d'acide acétique. Mélanger par agitation ⁽²⁾ les cristaux de xanthylurée et le liquide surnageant et verser le tout dans le creuset, tout en faisant dans la fiole un vide très modéré pour ne pas crever le filtre. Laver le tout avec le moins possible d'alcool méthylique absolu (2 à 5 cc au maximum). Dessécher demi-heure à 95-100°. Peser. Soit p le poids obtenu.

La dixanthylurée (PM = 420) pesant exactement sept fois plus que l'urée (PM = 60) qui lui a donné naissance, la quantité x d'urée par litre sera :

$$x = \frac{p}{7} \times \frac{1.000 \times 2}{15} = p \times 19.04$$

Bien entendu, si on a opéré sur un volume de liquide différent de 15 cc, le calcul sera modifié en conséquence.

Pour bien réussir cette opération, nous insistons sur les faits suivants :

1° Employer de l'alcool méthylique très pur et aussi concentré que possible.

2° Employer du xanthidrol également très pur ⁽³⁾.

3° Préparer la solution de xanthidrol au moment du besoin.

Les moindres impuretés dans les réactifs peuvent troubler la formation de la dixanthylurée et entraîner des erreurs souvent très fortes.

Il ne faut pas se dissimuler que, malgré sa simplicité, cette méthode est très délicate, du fait des soins minutieux qu'elle exige, et nous ne saurions trop recommander à ceux qui voudront l'employer de se faire la main, au préalable, en opérant avec des solutions d'urée de titre exactement connu.

⁽¹⁾ Une pompe de bicyclette à soupape inversée peut très bien servir à cet usage.

⁽²⁾ Se servir pour cela d'une baguette de verre munie d'un capuchon de caoutchouc, qui permet de bien détacher le produit adhérent aux parois.

⁽³⁾ GRIMBERT. — *Journal de Pharm. et Chim.* (16 Avril 1917).

Toutefois, bien appliquée, cette technique fournit des résultats très rigoureux : elle constitue un des plus remarquables progrès réalisés dans ces dernières années par la chimie analytique appliquée à la biologie.

Nous avons, au début de nos essais, essayé de préparer des filtres de Gooch, avec de l'amiante, comme on le fait souvent. Nous avons dû y renoncer. Il est, en effet, très difficile d'obtenir une épaisseur juste suffisante ; si elle est trop faible, de la xanthylurée peut traverser le filtre, si elle est trop grande, la filtration est très ralentie, souvent même impossible. C'est pourquoi nous avons adopté l'emploi du papier.

B. — Dosage de l'urée par l'hypobromite de soude

Le principe de cette méthode est bien connu :

L'hypobromite de soude, au contact de l'urée, la décompose par oxydation en CO_2 , N et H_2O . En présence d'un excès d'alcali, le gaz carbonique est retenu et l'azote se dégage seul accompagné de traces d'oxygène provenant de la décomposition du réactif. Pour éviter, dans la lecture du volume gazeux, les corrections dues à la pression atmosphérique et à la température, on fait une seconde opération de comparaison avec un volume connu d'une solution titrée d'urée chimiquement pure.

a. — DÉSALBUMINATION DU SANG

Pendant longtemps, on a désalbuminé le sang à l'alcool, selon les indications de Widal. Mais, le procédé exigeait une filtration souvent très longue et une évaporation d'alcool qui, devant être conduite avec le plus grand soin, rendait les opérations très délicates et même pénibles. L'alcool a été aussitôt abandonné dès que Moog a montré que le sang était parfaitement désalbuminé par l'acide trichloracétique.

Il suffit, pour cela, comme nous l'avons vu au sujet du dosage du glucose, de mélanger volumes égaux de sang ou de sérum et d'une solution aqueuse au cinquième d'acide trichloracétique, de centrifuger ou de filtrer.

C'est là la meilleure façon de désalbuminer le sang comme nous le verrons plus loin.

b. — DOSAGE DE L'URÉE

1° RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution d'urée pure et bien sèche à 1 p. 1.000.

b) Hypobromite de soude obtenu ⁽¹⁾ en mélangeant dans un flacon :

Lessive de soude pure.....	50 cc
Eau	100 cc
Brome.....	5 cc

Mélanger en refroidissant sous un jet d'eau froide.

c) Lessive de soude pure diluée à 1/2.

d) Solution alcoolique de phénol-phtaleïne à 1 p. 100.

2° APPAREIL NÉCESSAIRE : URÉOMÈTRE.

On a imaginé un nombre considérable d'appareils pour le dosage gazométrique de très petites quantités d'urée. La plupart nous paraissent compliqués et peu pratiques.

Depuis plus de onze ans, on utilise dans les hôpitaux de Bordeaux un uréomètre qui n'est autre que l'uréomètre de Denigès, adapté aux besoins de la cause (Issaly) ⁽²⁾. Il ne donne jamais de mécomptes, il est facile à construire dans n'importe quel laboratoire. C'est lui que nous avons employé et que nous décrirons à l'exclusion de tout autre :

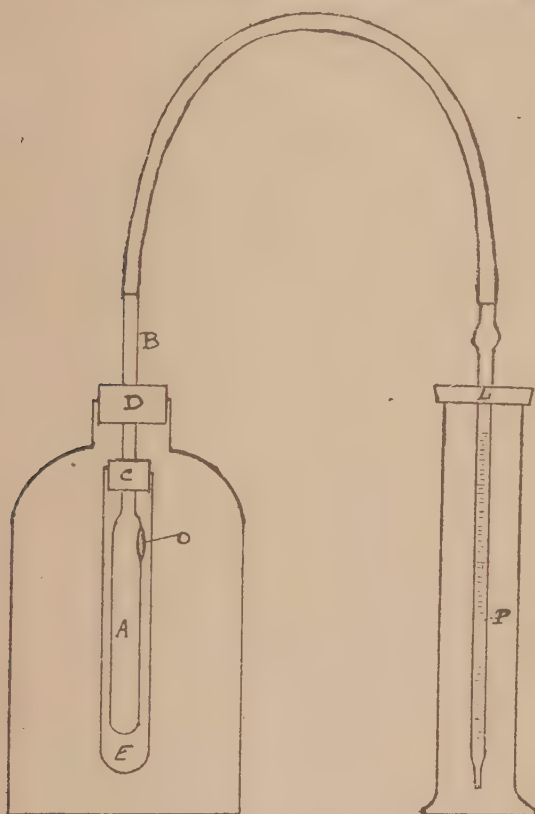
Il est constitué par un tube à essais A de 15 millim. de diamètre à l'extrémité ouverte duquel on a soudé un tube B de 5 millim. de diamètre et de 10 centimètres de longueur. Aux deux tiers supérieurs de la longueur du tube à essais est pratiquée à la soufflerie une ouverture O de 10 à 15 millim. Le tube terminal de 5 millim. traverse deux bouchons. L'un, en caoutchouc C, sert à boucher hermétiquement un tube de 20 millim. de diamètre au moins dans lequel pénétrera facilement le tube à essais. Le second bouchon, en liège, D, s'adapte sur un flacon de deux litres environ, rempli d'eau et fixe l'ensemble des tubes au sein de ce liquide destiné à conserver la température constante pendant toute la durée de l'opération.

⁽¹⁾ On peut aussi utiliser la formule de MILLIÈRE.

Bromure de potassium.....	2 gr.
Hypochlorite de soude à 30°.....	50 cc

⁽²⁾ ISSALY. — Uréomètre pour la mesure de petites quantités d'urée. — *Bull. des tra. de la Soc. de Pharmacie de Bordeaux* (Juin 1910).

L'extrémité libre du tube de 5 millim. est reliée par un tube de caoutchouc de bonne qualité et épais à une petite cloche



constituée par une pipette de 10^{cc}, P, graduée en dixièmes de centimètres cubes. Elle traverse, à frottement dur, une large rondelle de liège, L. Cette rondelle permet de maintenir la pipette dans une éprouvette remplie d'eau à la hauteur que l'on veut et de la manipuler sans l'échauffer avec les doigts.

3^e TECHNIQUE :

Dans le tube à essai intérieur A, on place 6^{cc} d'hypobromite de soude, dans le gros tube extérieur E, on met 10^{cc} de solution d'urée à 1 p. 1.000, on introduit le premier tube dans le second en bouchant bien avec le bouchon de caoutchouc. On fixe l'ensemble dans l'eau du flacon à l'aide du bouchon de liège; on réunit le tube de 5 millim. à la cloche à l'aide du tube de caoutchouc et on attend quelques instants, d'ailleurs très courts

que l'équilibre de température soit établi ; on le reconnaît à ce que le niveau de liquide dans la cloche graduée ne varie plus. On amène ⁽¹⁾ alors sur le même plan le niveau de l'eau dans l'éprouvette et dans la cloche en soulevant plus ou moins celle-ci à l'aide de la rondelle de liège, on lit la division à laquelle arrive le niveau de l'eau.

On incline alors le grand flacon de façon que l'hypobromite, sortant du tube intérieur par l'orifice latéral, vienne au contact de la solution d'urée : on agite *vigoureusement* et à *plusieurs reprises* pour activer le dégagement d'azote qui est complet lorsque le niveau du liquide dans la cloche ne varie plus après deux agitations. On attend quelques instants, on amène le niveau du liquide dans la cloche au niveau de celui de l'éprouvette et on lit à quelle division il arrive. La différence entre le premier chiffre lu et le dernier, indique la quantité d'azote dégagé par 10^{cc} de solution d'urée à 1 p. 1000, c'est-à-dire par un centigramme d'urée.

Ceci fait, on renouvelle la même opération, mais en remplaçant la solution titrée d'urée par le liquide sanguin désalbuminé. Pour cela on verse ce liquide *très exactement mesuré* dans le tube extérieur E avec 1 goutte de solution de phtaleine. On ajoute goutte à goutte de la soude diluée à 1/2 jusqu'à alcalinité, et on continue comme plus haut.

Soit V le volume d'azote dégagé par 1 centig. d'urée.

Soit V' d° d° d° d° X^{cc} de liquide centrifugé.

On a pour l'urée contenue dans un litre de sang ou de sérum :

$$\frac{0 \text{ gr. } 01 \times V' \times 2000}{V \times X} = n \text{ gr.}$$

Exemple :

Volume dégagé par 1 centig. d'urée = 3^{cc} 8.

d° d° par 12^{cc} de liquide centrifugé = 0^{cc} 8.

La quantité d'urée par litre sera :

$$\frac{0 \text{ gr. } 01 \times 0.8 \times 2000}{3.8 \times 12} = 0 \text{ gr. } 35.$$

⁽¹⁾ On pourrait intercaler un robinet à trois voies sur le trajet du caoutchouc, ce qui permettrait d'établir l'équilibre de pression sans soulever la cloche. Mais cette modification ne nous paraît pas recommandable, en ce sens, qu'elle complique inutilement l'appareil.

**c. — ESSAIS DE DOSAGE DE L'URÉE
APRÈS DÉSALBUMINATION PAR DES RÉACTIFS
AUTRES QUE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE**

Pour désalbuminer le sang dans lequel on veut doser l'urée, nous avons pensé remplacer l'acide trichloracétique par l'acide métaphosphorique et l'acide tungstique. Mais comme la teneur du sang en urée est assez faible, il faut obtenir un liquide clair aussi peu dilué que possible pour n'être pas obligé d'introduire de trop grands volumes de liquide dans l'appareil. Aussi, avons-nous dû employer des quantités de réactifs autres que celles qui nous ont réussi pour le dosage du glucose.

1° Désalbumination par l'Acide Métaphosphorique

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

- a**, Solution de métaphosphate de soude à 10 p. 100.
- b**) Acide sulfurique pur à 1 p. 10.

B. — TECHNIQUE :

Dans un tube à essai, mettre 10^{cc} de sang ou de sérum, ajouter 8^{cc} de solution de métaphosphate à 10 p. 100 et 2^{cc} d'acide sulfurique à 1 p. 10, agiter vigoureusement, attendre quinze minutes, filtrer ou centrifuger, on obtient un liquide représentant le sang dilué à moitié. On opère alors le dosage comme pour le sang désalbuminé par l'acide trichloracétique et les calculs sont les mêmes. Les résultats obtenus sont, en général, plus élevés qu'avec l'acide trichloracétique, bien que nous ayons constamment fait agir l'hypobromite en milieu nettement alcalin. D'autre part, le liquide obtenu après désalbumination est souvent coloré ou opalescent, ce qui est dû à une élimination incomplète de l'albumine. Nous avons essayé d'y remédier en augmentant la quantité de métaphosphate de soude, en remplaçant l'acide sulfurique à 1 p. 10 par l'acide azotique pur, le liquide a présenté toujours le même aspect et les résultats ne furent pas améliorés. L'acide métaphosphorique, excellent désalbuminant lorsqu'il s'agit d'avoir un liquide dilué, ne donne plus d'aussi bons résultats lorsqu'on se propose d'obtenir un liquide concentré.

2° Désalbumination par l'Acide Tungstique

A. — SOLUTIONS NÉCESSAIRES :

- a**) Solution de tungstate de sodium à 10 p. 100.
- b**) Acide sulfurique pur 2/3 N.

B. — TECHNIQUE :

Dans un tube à essai, mesurer 10^{cc} de sang ou de sérum, ajouter 10^{cc} de solution de tungstate de soude à 10 p. 100 et 10^{cc} d'acide sulfurique 2/3 N. Agiter vivement à plusieurs reprises ; au bout de quinze minutes au moins, filtrer ou centrifuger. On obtient un liquide représentant le sang délué au tiers. Mais ce mode de désalbumination donne lui aussi des résultats trop élevés, comme en fait foi le tableau suivant :

SANG	URÉE PAR LITRE DANS LES LIQUIDES DÉSALBUMINÉS à							
	Acide Trichloracétique		Acide Métaphosphorique et SO ⁴ H ³		Acide Métaphosphorique et SO ⁴ H ³ + NO ³ H		Acide Tungstique	
	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM	SANG	SÉRUM
Veau	0.21	0.30	0.30	0.26				
Veau	0.25	0.29	0.24	0.29				
Mouton	0.37	0.49	0.52	0.86				
Humain	2.50		2.60					
Mouton	0.35	0.32	0.70	0.59			0.52	0.64
Mouton	0.52	0.57	0.63	0.55		0.65	0.65	0.68
Bœuf	0.20	0.20	0.36	0.36	0.34	0.36	0.34	0.34
Veau	0.21	0.21	0.26	0.23	0.23	0.26	0.31	0.37
Veau	0.36	0.34	0.47	0.55	0.36	0.47	0.52	0.55
Mouton	0.64	0.70	0.72	0.86			0.78	0.89
Veau	0.37	0.27	0.29	0.43	0.35	0.37	0.27	0.25
Veau	0.32	0.37	0.48	0.59	0.43	0.51	0.40	0.37
Mouton	0.64	0.71	0.85	0.90	0.90	0.90	0.72	0.64
Mouton	0.36	0.36					0.43	0.43

Il s'en suit que pour le dosage de l'urée dans le sang, le meilleur réactif et le seul à employer jusqu'ici est l'acide trichloracétique.

Il est pratiquement indifférent en clinique d'opérer sur le sang ou le sérum ; la teneur en urée est sensiblement la même ; à ce sujet, nous sommes d'accord avec les travaux de Widal ⁽¹⁾.

Enfin, nous mettrons plus loin en parallèle les résultats fournis par la méthode de Fosse et la méthode gazométrique.

⁽¹⁾ WIDAL-WEILL-LONDON. — *C. R. de la Soc. de Biol.*, p. 492 (1912).

C. — Dosage de l'urée par l'uréase

Méthode de Folin modifiée par Grigaut et Guérin⁽¹⁾. Cette méthode est basée sur l'hydrolyse de l'urée par l'uréase contenue dans la farine de soja. Ce procédé comporte deux opérations : 1^o l'hydrolyse de l'urée, 2^o le dosage de l'azote formé.

I. — HYDROLYSE DE L'URÉE

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Suspension de farine de soja obtenue de la façon suivante :

Farine de soja (lamis n° 45).....	4 gr.
Phosphate acide de sodium pur.....	0 gr. 40
Eau distillée exempte d'ammoniaque.	100 ^{cc}

Dissoudre dans l'eau distillée le phosphate de soude, triturer dans un mortier la farine avec un peu de solution de phosphate, puis y ajouter le reste de la solution. Conserver dans un flacon et agiter au moment du besoin. La suspension de soja doit être renouvelée tous les deux jours.

B. — TECHNIQUE :

2^{cc} de sang ou de sérum non fluoré sont placés dans un large tube à essai, on y ajoute 4^{cc} de suspension de farine de soja agitée. On mélange et on maintient au bain-marie à 56° pendant quinze minutes, en ayant soin d'agiter de temps en temps pour maintenir la farine de soja en suspension. Au bout de 15 minutes, ajouter 6^{cc} d'acide trichloracétique à 20 p. 100, agiter vivement et filtrer ; le liquide filtré représente le sang dilué à 1 p. 6.

II. — DOSAGE DE L'AZOTE

A. — RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) Solution titrée de sulfate d'ammoniaque.

b) Réactif de Nessler.

Ces deux réactifs sont ceux dont on a donné la formule pour le dosage de l'azote non protéique.

c) Solution de soude à 10 p. 100 exempte de carbonates.

⁽¹⁾ GRIGAUT et GUÉRIN. — *Soc. Biol.* (1919), n° 1, p. 25. — Procédé précis de dosage de l'urée dans de faibles quantités de sang.

B. — TECHNIQUE :

Prendre deux flacons jaugés de 50^{cc}. Dans l'un, mesurer 6^{cc} du filtrat trichloracétique représentant 1^{cc} de sang.

Dans l'autre, 25^{cc} de solution type de sulfate d'ammoniaque, correspondant à 0 milligr. 25 d'azote et 3^{cc} d'acide trichloracétique à 20 p. 100.

Dans les deux flacons jaugés, ajouter 40^{cc} d'eau distillée, 3^{cc} de soude à 10 p. 100 et 5^{cc} de réactif de Nessler et on complète à 50^{cc}. On agite et on fait l'examen colorimétrique immédiatement. Les résultats obtenus multipliés par 1000 indiquent la quantité d'azote uréique en milligr. par litre de sang.

En suivant cette technique, et même après avoir essayé de la modifier, nous avons constamment obtenu des résultats notablement inférieurs à ceux que fournissent les méthodes précédentes. On en jugera par le tableau suivant :

SANG	URÉE DOSÉE PAR		
	Uréase	Hypobromite	Xanthidrol
Cheval	0 gr. 20	0 gr. 50	
Mouton	0 gr. 14	0 gr. 57	0 gr. 24
Humain	1 gr. 25	1 gr. 38	
Veau	0 gr. 12	0 gr. 15	0 gr. 07
Humain	0 gr. 19	0 gr. 45	0 gr. 446
Mouton	0 gr. 15	0 gr. 50	0 gr. 475
Mouton	0 gr. 10	0 gr. 42	0 gr. 40
Mouton	0 gr. 16	0 gr. 61	0 gr. 56
Mouton	0 gr. 10	0 gr. 38	0 gr. 34
Mouton	0 gr. 10	0 gr. 34	0 gr. 32
Mouton	0 gr. 09	0 gr. 33	0 gr. 30
Veau	0 gr. 14	0 gr. 47	0 gr. 41
Humain	0 gr. 12	0 gr. 57	0 gr. 46
Bœuf	0 gr. 10	0 gr. 38	0 gr. 34

Faut-il l'attribuer à un défaut d'activité de la farine de soja employée ? C'est possible. En tout cas, nous n'avons pas pu le vérifier, car nous n'avons réussi qu'à nous procurer un seul échantillon de cette farine, et encore avec les plus grandes difficultés. En tout cas, la méthode ne nous paraît pas recommandable dans la pratique courante et sans la condamner d'une façon définitive, nous la déconseillons nettement.

D. — Azote résiduel

On l'obtient, comme nous l'avons dit, en retranchant l'azote ureique ⁽¹⁾ de l'azote non proteique. Il s'en suit que pour avoir l'azote résiduel vrai, l'urée devra être déterminée par la méthode au xanthidrol. C'est donc là une indication très nette de l'emploi de ce procédé ; mais nous croyons, au moins actuellement, que ce soit la seule.

En effet, l'écart entre les résultats du dosage à l'hypobromite et ceux du dosage au xanthidrol, est assez faible chez les sujets normaux, et, cet écart, s'atténue encore chez les grands azotémiques ⁽²⁾ ; de telle sorte, qu'à la méthode à l'hypobromite est très suffisante pour l'examen des fonctions rénales et pour l'établissement de la constante d'Ambard. Cet écart ne prend vraiment d'importance que chez certains hépatiques dont l'azote résiduel est très élevé. Aussi, sommes-nous d'accord avec Laudat pour dire que dans la majorité des cas, la méthode vraiment clinique et à la portée de tous est celle de l'hypobromite telle que nous l'avons décrite. Ses indications sont très suffisantes, sauf dans le cas où il faut déterminer l'azote résiduel, de façon exacte : la méthode au xanthidrol doit alors avoir la préférence.

(1) Pour avoir l'azote ureique, il suffit de multiplier le chiffre de l'urée par le facteur 0,466.

(2) Voir LAUDAT, loc., cit.

CHAPITRE VI

Dosage de l'Acide urique

Le dosage de l'acide urique dans le sang est entré dans le domaine clinique, car il peut donner de bonnes indications dans certains cas pathologiques, goutte, gravelle, néphrite, etc. Pour doser ce corps dans l'urine, les procédés sont nombreux ; la plupart consistent à insolubiliser l'acide urique sous forme d'urate d'ammoniaque, d'urate ammoniaco-magnésien, d'urate d'argent et de magnésium ⁽¹⁾, d'urate cuivreux. Ces composés ne sont pas rigoureusement insolubles. Si pour l'urine, qui contient normalement de notables quantités d'acide urique, cette faible solution est sans inconvénients, il n'en est pas de même pour le sang qui, à l'état normal, renferme de 20 à 40 milligrammes de ce composé par litre. Aussi, les procédés de dosage basés sur l'estimation diaphanométrique des corps insolubles cités plus haut, sont-ils trop peu sensibles et inexacts quand on veut les appliquer au dosage de l'acide urique dans le sang.

L'acide urique en solution réduit le réactif phosphotungstique de Denis et Folin, en donnant une coloration bleue proportionnelle à la quantité d'acide urique mise en œuvre, d'où la possibilité d'effectuer un dosage colorimétrique. Folin ⁽²⁾ a indiqué pour le sang un mode opératoire dont voici les grandes lignes :

⁽¹⁾ GRAVES et KOBER. — Dosage néphélométrique des purines, de l'acide urique dans l'urine et dans le sang. — *Ann. Chem. Soc.* t. 37, p. 2430 (1915).

⁽²⁾ FOLIN. — A system of blood analysis. — *Journal Biol. chim.* (t. 38, p. 31, 1919).

Dans le sang désalbuminé, l'acide urique est insolubilisé sous forme d'urate d'argent ; cet urate d'argent, recueilli par centrifugation, est décomposé à l'aide d'une solution chlorhydrique de chlorure de sodium ; enfin, sur le liquide séparé du chlorure d'argent formé on fait agir le réactif phosphomolybdique après action du cyanure de sodium en présence de carbonate de soude. Mais, nous avons vu que l'urate d'argent n'est pas absolument insoluble, de telle sorte que le procédé se trouve entaché d'erreur par défaut.

Grigaut ⁽¹⁾ a modifié le mode opératoire de Folin en supprimant la précipitation de l'urate d'argent, après s'être assuré que le sang ne renferme pas de phénols susceptibles d'agir sur le réactif de Folin et Denis et que ce même réactif n'est influencé ni par les purines, ni par les bases pyrimidiques, ni par les nucléosides, ni par les uréides, ni par la créatine ou la créatinine ⁽²⁾.

C'est cette technique modifiée que nous avons contrôlée et que nous allons décrire.

A. — DÉSALBUMINATION DU SANG

Elle se fait par l'acide trichloracétique, comme pour le dosage de l'urée dans le sang.

B. — DOSAGE

1° RÉACTIFS NÉCESSAIRES :

a) *Réactif phosphotungstique de Folin et Denis.* — Porter à l'ébullition pendant une heure dans un matras muni d'un appareil à réfrigération à reflux — qui peut être simplement un petit entonnoir renversé — le mélange suivant :

Tungstate de soude.....	100 gr.
Acide phosphorique à 60° (85 %)	80 cc
Eau distillée.....	800 cc

On laisse refroidir et on complète la solution au litre avec de l'eau distillée.

⁽¹⁾ GRIGAUT. — Procédé colorimétrique de dosage de l'acide urique dans le sang. — *C. R. Soc de Biol.* (t. 83, p. 1273, 1920).

⁽²⁾ GRIGAUT. — Spécificité de la réaction phosphotungstique pour le dosage de l'acide urique. — *C. R. de la Soc. de Biol.*, t. 84, p. 632 (1921).

b) *Solution d'acide urique à 0 gr. 20 par litre.* — Placer dans un ballon jaugé d'un litre, 0 gr. 20 d'acide urique pur, en suspension dans quelques centimètres cubes d'eau et ajouter 400 à 500^{cc} d'eau chaude contenant en solution 9 gr. de phosphate disodique pur et cristallisé et 1 gr. de phosphate monosodique cristallisé (1). Le mélange est agité jusqu'à dissolution complète de l'acide urique, puis additionné, après refroidissement, de 1^{cc} 4 d'acide acétique cristallisable. Compléter à 1.000^{cc} avec de l'eau distillée, mélanger et ajouter 5^{cc} de chloroforme pour empêcher la formation de bactéries. Il est prudent de renouveler cette solution tous les quinze jours.

c) *Solution de carbonate de soude cristallisé à 40 p. 100.*

C. — TECHNIQUE :

Préparation des étalons. — A l'aide de la solution d'acide urique à 0 gr. 20 p. 100, on prépare les solutions suivantes pour chaque dosage, leur titre baissant rapidement :

Solution à 0 gr. 20 diluée au 1/4 correspondant à 0 gr. 5 par litre

d°	d°	d°	1/5	d°	à 0 gr. 04	d°
d°	d°	d°	3/20	d°	à 0 gr. 03	d°
d°	d°	d°	1/10	d°	à 0 gr. 02	d°
d°	d°	d°	1/20	d°	à 0 gr. 01	d°
d°	d°	d°	1/40	d°	à 0 gr. 005	d°

Choisir sept tubes à essais de même diamètre. Dans les six premiers, mettre 2^{cc} 5 de chacune de ces solutions et 2^{cc} 5 d'acide trichloracétique. La solution d'acide urique se trouve ainsi dans les mêmes conditions que le liquide sanguin dilué au demi.

Dans le septième tube, mettre 5^{cc} du filtrat sanguin.

Verser dans les sept tubes 2^{cc} de réactif de Folin et Denis, et, aussi rapidement que possible, 15^{cc} de solution de carbonate de soude cristallisé à 40 p. 100. Attendre une minute et procéder au dosage colorimétrique. Pour permettre d'effectuer plus vite le dosage et aussi pour le rendre plus précis, nous avons multiplié les étalons alors que l'auteur prescrivait de n'en établir qu'un seul. Par cette modification, l'égalité de teinte est obtenue plus rapidement.

Cette technique ne présente aucune difficulté. Pour en vérifier

(1) On peut très bien remplacer ce dernier sel par une quantité égale de phosphate disodique.

l'exactitude, nous avons ajouté des quantités connues d'acide urique à des sangs dont nous connaissions déjà la teneur en ce composé; chaque fois, nous avons retrouvé les quantités ajoutées.

D'après Grigaut, la seule cause d'erreur pourrait venir du passage dans le sang, sous l'influence de médicaments, par exemple, de certains polyphénols (résorcine, gaïacol, créosote, tannin, adrénaline, dérivé de l'oxyméthylantraquinone, etc.).

Nous avons également constaté qu'on pourrait indifféremment opérer le dosage soit sur le sérum, soit sur le sang entier.

ESPÈCE	ACIDE URIQUE PAR LITRE	
	SANG	SÉRUM
Homme.	0 gr. 06	0 gr. 06
Homme.	0 gr. 06	0 gr. 055
Mouton.	0 gr. 05	0 gr. 04

Le sulfate mercurique donne un trouble net avec les solutions contenant un centigramme d'acide urique par litre⁽¹⁾. Nous avons pensé utiliser cette propriété pour le dosage qui nous occupe. Nous avons dû y renoncer, la sensibilité de la réaction étant nettement diminuée dès qu'on opère en présence trichloracétique; il faut, en effet, au moins deux centigrammes d'acide urique par litre pour apprécier le louche formé dans ces conditions. Or, comme le liquide sur lequel on opère représente le sang dédoublé, le dosage de quantités normales d'acide urique devient pratiquement irréalisable.

C'est pour une raison analogue que nous n'avons pas essayé le réactif de Folin, après désalbumination par les acides tungstique ou métaphosphorique; en a vu, en effet, qu'on n'obtient dans ce cas une bonne défécation que lorsque le liquide final représente le sang dilué au dixième. Cette grande dilution ne permettrait pas d'appliquer la réaction insuffisamment sensible pour cela.

(1) G. DENIGÈS. — Précis de chimie analytique.

APPENDICE

Ce travail ne comporte pas de conclusions générales. Chaque chapitre traitant, en somme, un sujet spécial, a été suivi de conclusions particulières qui en découlaient. Parmi les nombreuses substances qu'on peut doser dans le sang ou dans le sérum, nous avons fixé notre attention sur celles dont la détermination peut être le plus souvent demandée au chimiste : les chlorures, le phosphore, le glucose, l'azote non protéique, l'urée et l'acide urique.

De très nombreuses méthodes ayant été proposées pour doser ces composés, nous en avons choisi quelques-unes, paraissant se recommander, à la fois, par leur simplicité et leur exactitude. Nous les avons étudiées, vérifiées, parfois modifiées dans leurs détails, dans la pensée d'épargner à nos confrères la peine de faire un choix souvent difficile à priori et d'exercer un contrôle préalable toujours fastidieux. Comme nous l'avons dit au début, tel a été notre but ; nous serons pleinement satisfait, si nous l'avons atteint.

Vu :

Le Doyen,
D^r C. SIGALAS.

Vu : Bon à imprimer,

Le Président,
D^r DUPOUY.

Vu et permis d'imprimer :

Bordeaux, le 20 Décembre 1921.

Le Recteur de l'Académie,
R. THAMIN.

IMPRIMERIE LIBOURNAISE

- 68, rue Président-Carnot et rue Orbe, 27
